Kwartalnik
Tom 53
Zeszyt 1•2014
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 53 (1)
2014

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)
Impact Factor ISI = 0,151 (2012)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2012)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), JERZY HREBENDA (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

Stali recenzenci:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
JÓZEF KUR (Politechnika Gdańska), EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Prototheca blaschkeae – stadia rozwojowe: sporangia i sporangiospory. SEM, pow. 2 000 x.
Autor zdjęcia: dr n. med. Tomasz Jagielski; Zakład Mikrobiologii Stosowanej,
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego,
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150, Objętość 13 arkuszy wyd., Papier offset 80 g

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 3–13
http://www.pm.microbiology.pl

WEWNĄTRZKOMÓRKOWE RECEPTORY NOD-PODOBNE SKUTKI MUTACJI W OBRĘBIE ICH GENÓW

Magdalena Osiak[1], Natalia Pająk[1], Halina Antosz[1]*

[1] Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie,
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

Wpłynęło w listpadzie 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzina receptorów NOD-podobnych. 2.1. Podrodzina NLRP. 2.2. Podrodzina NLRC. 2.3 Podrodzina NLRA. 2.4. Podrodzina NLRB. 2.5 Podrodzina NLRX. 3.Udział NLR w tworzeniu platform molekularnych-inflamasomów. 4. Choroby wywołane mutacjami w genach NLR. 4.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna. 4.2. Choroba Blau'a. 4.3. Zespół okresowej gorączki. 4.4. Sarkoidoza. 4.5. Choroby alergiczne. 4.6. Zespół nagich limfocytów. 4.7. Niepowodzenia rozrodu. 4.8. Bielactwo. 5. Podsumowanie

Intracellular NOD-like receptors, implications of mutations in their genes

Abstract: The response of the innate immune system depends inter alia on the activity of a family of NOD-like receptors (NLR). The NLR includes subfamilies of NLRP, NLRA, NLRB, NLRC, and NLRX. Active members of the NLRC subfamily ie NOD1 and NOD2 through recognizing ligands present in the cytosol activate the signaling pathway of the nuclear factor NF-κB. Other members of the NLR form large intracellular complexes called inflammasome and after binding the ligand they activate caspase 1, which splits pro-IL-1β, making it possible to release the active IL-1β outside the cell. It has been shown that mutations in certain NLR genes are associated with the development of numerous diseases including Crohn's disease, Blau syndrome, cryopyrin-associated periodic fever syndrome, sarcoidosis, hydatidiform mole, testicular seminoma, allergic diseases, bare lymphocytic syndrome and vitiligo.

Contents: 1. Introduction. 2. NOD-like receptors family. 2.2. NLRP subfamily. 2.3. NLRC subfamily. 2.4. NLRA subfamily. 2.5. NLRB subfamily. 2.5. NLRX subfamily. 3. NLR participation in the creation of molecular platforms – inflammasome. 4. Diseases caused by mutations in NLR genes. 4.1. Leśniowski-Crohn disease. 4.2. Blau syndrome. 4.3. Cryopyrin-associated periodic fever syndrome. 4.4. Sarcoidosis. 4.5. Allergic diseases. 4.6. Bare lymphocytic syndrome. 4.7. Reproductive failure. 4.8. Vitiligo. 5. Summary

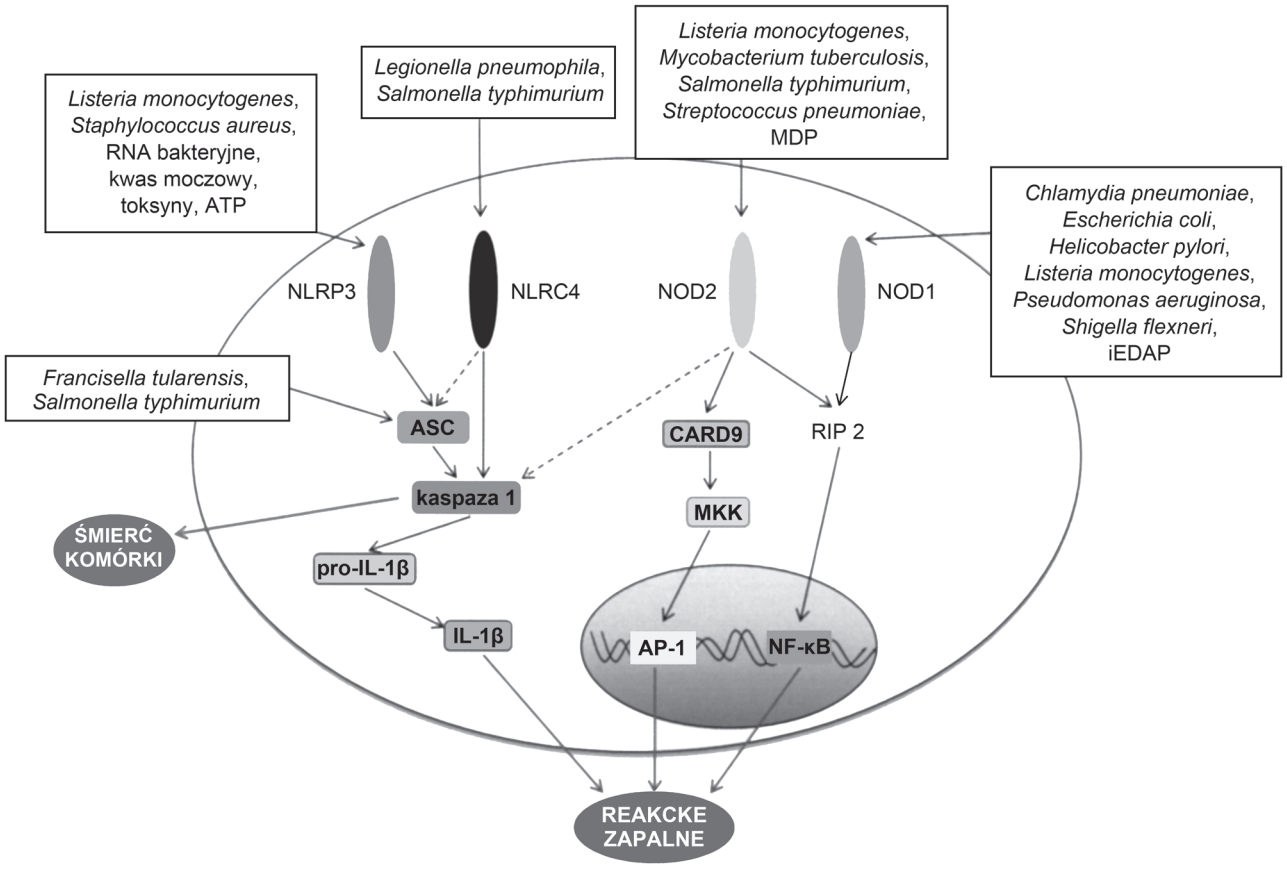
Słowa kluczowe: inflamasomy, kaspaza 1, NF-κB, receptory NOD-podobne
Key words: caspase 1, inflammasome, NF-κB, NOD-like receptros

1. Wprowadzenie

Wrodzone mechanizmy układu odpornościowego stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami. Zostają włączane natychmiast po infekcji i nie wymagają somatycznej rearanżacji genów, bezwzględnie koniecznej w przypadku odporności adaptacyjnej. Konserwatywne struktury drobnoustrojów, znane jako PAMPs (*patogen associated molecular pattern*) czyli wzorce molekularne związane z patogenami lub cząsteczki nieinfekcyjne – DAMPs (*damage-associated molecular pattern molecules*) są rozpoznawane przez receptory odporności wrodzonej tzw. receptory rozpoznające patogeny (PRRs; *pattern recognition receptors*). Rozpoznanie PAMPs lub DAMPs przez PRRs powoduje uruchomienie ścieżek sygnałowych, które promują zapalną odpowiedź antybakteryjną. Wśród PRRs zidentyfikowano trzy główne klasy receptorów: przezbłonowe receptory Toll-podobne rozpoznające ligandy na powierzchni komórki lub w endosomach, rozpoznające domeny cytoplazmatyczne, wewnątrzkomórkowe receptory NOD-podobne (NLR; *NOD-like receptor*) rozpoznające struktury bakteryjne oraz receptory RIG-I (*retinoicacid-inducible gene I*), które są cytoplazmatycznymi receptorami rozpoznającymi wirusowe kwasy nukleinowe znajdujące się w cytozolu [18, 35, 38].

Białka NOD-podobne są dużą grupą receptorów, które stanowią istotny składnik wrodzonego układu odpornościowego gospodarza. W przeciągu kilkunastu lat od ich odkrycia poznano mechanizmy, dzięki którym rozpoznają one drobnoustroje, aktywują zapalne szlaki sygnałowe, regulują sygnalizację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (*nuclear factor kappa B*), indukują produkcję interleukiny 1β (IL-1β; interleukin 1β) i śmierć komórek. Wykazano, że poza rozpoznawaniem mikroorganizmów są zaangażowane również, jako czujniki endogennych patogenów niezakaźnych, oraz sygnałów stresu, co w obu przypadkach prowadzi do mobilizacji zapalnych ścieżek sygnalizacyjnych aktywujących poza NF-κB, kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK; *mitogen-activated protein kinases*) oraz adaptorowe białko apoptotyczne ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD*) przyłączające kaspazę (rys. 1). Właściwości te pozwoliły uplasować je w grupie receptorów istotnych w patogenezie różnych chorób zakaźnych człowieka [21, 32].

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin; e-mail: hagenetyka@wp.pl



Rys. 1. Aktywacja NLR przez produkty bakteryjne i ligandy endogenne (objaśnienia w tekście)

2. Rodzina receptorów NOD-podobnych

NLR charakteryzuje budowa konserwatywna. W swej strukturze białka te zawierają 3 domeny. Na N-końcu znajduje się domena efektorowa, centralna część obejmuje domena NBD odpowiadająca za wiązanie nukleotydów i oligomeryzację receptora, zaś C-koniec białka stanowi domena LRR (*leucine rich repeats*) bogata w powtórzenia leucynowe [6, 33, 70]. Ze względu na typ domeny N-końcowej oraz różną konstrukcję pozostałych domen rodzinę receptorów NLR, obejmującą 23 członków, podzielono na 5 podrodzin (NLRP, NLRC, NLRA, NLRB, NLRX) co zostało zatwierdzone przez Międzynarodowy Komitet HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) [63]. Ogólną charakterystykę poszczególnych grup receptorów NLR przedstawiono w tabeli I i II.

2.1. Podrodzina NLRP

Podrodzina NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, leucinerich repeat and pyrin domain containing*) zwana również NALP, skupia 14 cytoplazmatycznych białek. Wspólną cechą członków tej podrodziny jest rekrutacja adaptorowego białka ASC poprzez wzajemne oddziaływanie efektorowej domeny PYD (*pyrin domain*) [55] receptora z homologiczną domeną PYD białka ASC. Domena PYD występuje w N-końcowej części białka ASC, zaś C-koniec tego białka stanowi domena CARD, która umożliwia przyłączenie do platformy inflamasomu kaspazy 1 poprzez interakcję CARD-CARD. Podstawową funkcją aktywnej kaspazy 1 jest przetworzenie cytokin zapalnych pro-IL-1β i pro-IL-18 w ich dojrzałe i aktywne formy, w wyniku czego dochodzi do reakcji zapalnych i śmierci komórki [59]. Dwóch członków podrodziny NLRP tj. NLRP1 i NALP10 posiada nieco inną budowę. Białko NLRP1, w regionie C-końcowym wyróżnia obecność dodatkowej domeny FIIND [15] oraz domeny CARD (*caspase recruitment domain containing*) [3]. Funkcja domeny FIIND nie została jeszcze opisana. Domena CARD oddziałuje z kaspazami biorącymi udział w apoptozie i zapaleniu, w tym z kaspazą 1. Wykazano również, że CARD pośredniczy w interakcji niezależnej od kaspaz, odpowiada za wiązanie białek sygnałowych i transdukcję sygnałów wewnątrzkomórkowych [1, 11]. Środkowa domena NBD (*nucleotide-binding oligomerization domain)* odpowiada za ATP-zależną regulację oligomeryzacji receptora, natomiast C-końcowa za rozpoznawanie ligandów (składników mikrobiologicznych) [3]. NLRP1 bierze udział zarówno w aktywacji mechanizmów proapoptotycznych (aktywacja kaspazy 2

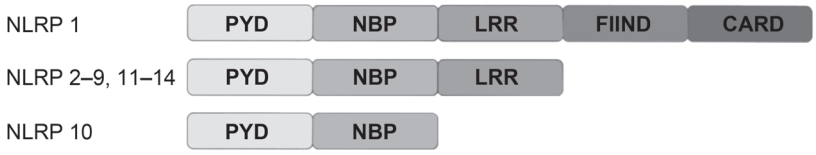
Tabela I

Charakterystyka podrodziny receptorów NLRP. Opracowano według: [2, 3, 20, 27, 28, 33, 34, 37, 50, 54, 55, 70]

Nazwa receptora	Lokalizacja genu w chromosomie	Występowanie w tkankach	Funkcja	Rozpoznawane drobnoustroje
NLRP				
NLRP1 CARD7, DEFCAP, NAC, NALP1, CLR17.1	17p13.2	serce, grasica, śledziona, leukocyty krwi obwodowej, monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty B i T, żołądek, neurony, jądra	aktywacja kaspazy 1, kaspazy 2, kaspazy 3 oraz kaspazy 5	*B. anthracis*
NLRP2 PYPAF2, CLR19.9, PAN1, NALP2, NBS1	19q13.2	grasica, trzustka, płuca	inhibicja NF-κB	–
NLRP3 PYPAF1, Cryopyrin, CIAS1, NALP3, CLR1.1	1q44	leukocyty krwi obwodowej, chondrocyty, monocyty, limfocyty B, komórki dendrytyczne, gardło, przełuk	aktywacja kaspazy 1	*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *B. pertussis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*
NLRP4 PYPAF4, CLR19.5, PAN2, NALP4, RNH2	19q13.42	śledziona, nerki, płuca, wątroba, łożysko,grasica, trzustka	aktywacja Bekliny-1	–
NLRP5 PYPAF8, CLR19.8, Mater, NALP5, PAN11	19q13.42	oocyty	roawój embronalny	–
NLRP6 PYPAF5, CLR11.4, NALP6, PAN3	11p15	granulocyty, monocyty, limfocyty B i T, eozynofile, komórki dendrytyczne, nabłonek	aktywacja kaspazy 1 oraz NF-κB	*L. monocytogenes*, *S. typhi*, *E. coli*
NLRP7 NOD12, PYPAF3, CLR19.4, PAN7, NALP7	19q13.42	brak danych	inhibicja kaspazy 1	*L. monocytogenes*, *S. aureus*
NLRP8 NOD16, CLR19.4, PAN4, NALP8	19q13.42	brak danych	brak danych	–
NLRP9 PAN12, NALP9, NOD6, CLR19.1	19q13.42	oocyty, jądra, płuca, łożysko, grasica, mózg, prostata	rozwój embrionalny	–
NLRP10 NOD8, PYNOD, CLR11.1, PAN5, NALP10	11p15.4	mózg, serce, mięśnie szkieletowe, monocyty	inhibicja kaspazy 1 oraz NF-κB	*C. albicans*
NLRP11 NOD17, PYPAF6/7, CLR19.6, PAN10, NALP11	19q13.42	brak danych	brak danych	–
NLRP12 PYPAF7, CLR19.3, Monarch 1, PAN6, RON2, NALP12	19q13.42	granulocyty, komórki dendrytyczne, monocyty, leukocyty	inhibicja NF-κB	*Y. pestis*
NLRP13 NOD14, CLR19.7, PAN13, NALP13	19q13.42	brak danych	brak danych	–
NLRP14 NOD5, CLR11.2, PAN8, NALP14	11p15.4	jądra	udział w spermatogenezie	–

i kaspazy 3) i prozapalnych (aktywacja kaspazy 1 i kaspazy 5) [53]. Białko NALP10 natomiast jest jedynym przedstawicielem tej podrodziny, w strukturze którego nie stwierdzono domeny LRR. Pomimo tego braku receptor jest funkcjonalnie sprawny i odpowiada za inhibicję kaspazy 1 oraz czynnika transkrypcyjnego NF-κB (rys. 2) [17].

Geny podrodziny NLRP zajmują *locus* w czterech różnych chromosomach. Podrodziny NLRP 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 i 13 są skupione bardzo blisko siebie



Rys. 2. Domeny funkcjonalne receptorów z podrodziny NLRP- (objaśnienia w tekście)

w chromosomie 19. Najbliżej zlokalizowane są geny *NLRP5* i *NLRP13*, co może sugerować, że oba produkty genowe mogą pełnić podobną funkcję. Geny *NLRP6, NLRP10* oraz *NLRP14* zlokalizowane są w chromosomie 11, gen *NLRP1* w chromosomie 17 zaś *locus NLRP3* znajduje się w chromosomie 1 [55].

W oparciu o sekwencje białkowe dokonano analizy filogenetycznej podrodziny NLRP. Badania wykazały wysoką homologię pomiędzy receptorami myszy i człowieka, z wyjątkiem receptora NLRP8. Transkrypty *NLRP5, NLRP8, NLRP9* oraz białko NLRP5 zostały także wykryte również w bydlęcych oocytach i preimplantacyjnych zarodkach [72].

Geny większości członków tej podrodziny wykazują ekspresję w różnych tkankach i organizmach począwszy od *Caenorhabditis elegans*, poprzez *Drosophila melanogaster*, szczury i myszy, na człowieku kończąc. Produkty białkowe genów *NLRP* poza rolą we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, pełnią również ważną funkcję w układzie rozrodczym i w rozwoju zarodka. Okazuje się, że ekspresja kilku genów *NLRP* jest wyraźna w oocytach ssaków [72]. Badania przeprowadzone na myszach

Tabela II

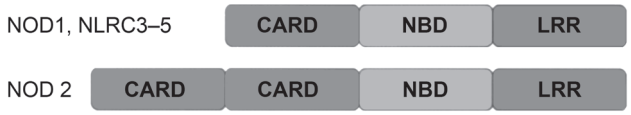
Charakterystyka receptorów podrodzin NLRC, NLRA, NLRB oraz NLRX. Opracowano według : [1, 11, 12, 20, 31, 33, 50, 54, 57, 70]

Nazwa receptora	Lokalizacja genu w chromosomie	Występowanie w tkankach	Funkcja	Rozpoznawane drobnoustroje
NLRC				
NOD1 CARD4, CLR7.1, NLRC2	17p13.2	serce śledziona, łożysko, nabłonek płuc, jajniki, trzustki, mięśnie szkieletowe, jądra, monocyty, komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty B	aktywacja NF-κB	*Ch. pneumoniae*, *E. coli*, *H. pylori*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. flexneri*, *N. gonorrhoeae*
NOD2 CARD15, CLR16.3, NLRC2, CD, BLAU, IBD1, PSORAS1	16q12.1	monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty B, granulocyty, komórki nabłonka jelit, jamu ustnej i płuc, komórki Panetha	aktywacja NF-κB, AP 1 oraz IRF3	*L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae*
NLRC3 NOD3, CLR16.2	16p13.3	limfocyty B i T, komórki NK, grasica, nerki, macica	negatywna regulacja NF-κB	–
NLRC4 CARD12, CLR2.1, CLAN, IPAF	2p22.3	szpik kostny, makrofagi, jelito grube, nerki, wątroba, płuca, śledziona, serce, jądra	aktywacja kaspazy 1	*L. pneumophila*, *S. typhium, C. violaceum*, *B. pseudomallei*, *E. coli*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*
NLRC5 NOD27, CLR16.1	16q13	komórki dendrytyczne, makrofagi	regulacja ekspresji MHC I, negatywna regulacja NF-κB	–
NLRA				
CITA MHCITA, NLRA, C2TA	16p13	limfocyty B, komórki dendrytyczne, monocyty	egulacja ekspresji MHC II	–
NLRB				
NAIP BIRC1, CLR5.1, NLRB1	5q13.1	Makrofagi	inhibicja kaspazy 3 oraz kaspazy 7	*C. violaceum*, *S. typhi, B. pseudomallei*, *E. coli*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*
NLRX				
NLRX1 CLR5.1, NOD9	11p23.3	brak danych	negatywna regulacja NF-κB	–

wykazały, że zmniejszona ekspresja receptorów NLRP wiąże się z procesem starzenia oocytu. *NLRP5* był jednym z pierwszych zidentyfikowanych genów u myszy, kodujących mRNA niezbędny do pomyślnego rozwoju zapłodnionego oocytu [72].

2.2. Podrodzina NLRC

Do podrodziny NLRC zaliczono 5 białek: NOD1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*), NOD2, NLRC3, NLRC 4 i NLRC 5. Spośród tej grupy, najlepiej poznano receptory NOD1 i NOD2. Są to duże białka cytoplazmatyczne [27, 37]. O podziale tych białek decyduje obecność w N-końcowej domeny efektorowej, jednej cząsteczki CARD w NOD1 i dwóch w NOD2 (rys. 3).



Rys. 3. Domeny funkcjonalne receptorów z podrodziny NLRC- (objaśnienia w tekście)

Receptory te rozpoznają reszty peptydoglikanu ścian bakteryjnych. Ligandem dla NOD1 jest dwupeptyd kwasu γ-D-glutamylo-mezo-diaminopimelinowego (iEDAP), który jest wytwarzany przez większość bakterii Gram-ujemnych, oraz przez niektóre bakterie Gram-dodatnie (np. *Bacillus* spp.). Z kolei NOD2 aktywowany jest przez dwupeptyd muramylowy (MDP), który jest składnikiem praktycznie wszystkich rodzajów peptydoglikanu zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [31]. Receptory NOD1 i NOD2 po rozpoznaniu odpowiednich ligandów, ulegają oligomeryzacji i przyłączają białko adaptorowe RIP2 (*receptor interacting protein 2*), które również zawiera domenę CARD. Konsekwencją tego oddziaływania jest uruchomienie kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do uwolnienia czynnika NF-κB (*nuclear factor κB*) oraz AP-1 (*activator protein 1*), które są odpowiedzialne za produkcję cytokin prozapalnych. Dodatkowo zostają uwolnione czynniki IRF3 i IRF7 (*interferon regulatory factor 3, 7*), indukujące uwalnianie interferon β typu I (IFN-β) [31,33]. W przypadku receptora NOD2 istnieje również alternatywny szlak aktywacji poprzez wirusowe ssRNA (*single-stranded RNA*). Ta droga prowadzi do uwolnienia IRF3 oraz NF-κB. Skoordynowana aktywacja ścieżek sygnalizacyjnych NF-κB i IRF3 prowadzi do utworzenia wielobiałkowego kompleksu wzmacniającego, który napędza ekspresję interferonu-β (IFN-β) a poprzez to odporność przeciwwirusową [24, 58].

Ponadto receptory NOD1 i NOD2 biorą udział w procesie autofagii (autofagocytozy). Proces ten z udziałem NOD1 i NOD2 polega na ich kooperacji z białkiem ATG16L1 (*autophagy related 16-like 1*) [25]. W momencie infekcji bakteryjnej oba współdziałające białka przemieszczają się w kierunku błony komórkowej uczestnicząc w tworzeniu pęcherzyków autofagocytarnych wokół bakterii [68]. NOD1 i NOD2 są także zaangażowane w proces tworzenia wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species* – ROS), co jest nieodzownym elementem odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej. ROS bezpośrednio uczestniczą w aktywacji oksydazy DUOX2 (*dual oxidase 2 protein*). Podczas zakażenia w fagocytach przy udziale DUOX2 następuje uwolnienie nadtlenku wodoru, który ma właściwości bakteriobójcze [40].

Do podrodziny NLRC należy również receptor NLRC4 inaczej zwany IPAF. Dzięki domenie CARD bezpośrednio wchodzi w interakcje z prokaspazą 1. W odpowiedzi na bodźce prozapalne i apoptotyczne poprzez oddziaływania CARD-CARD NLRC4 staje się w ten sposób aktywatorem kaspazy 1. Pomimo podobnej budowy do NOD1 i NOD2, białko to nie bierze udziału w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB [54].

Do grupy tej należy również receptor NOD3, który wywiera hamujący wpływ na TLR-zależne uwalnianie czynnika NF-κB [57].

2.3. Podrodzina NLRA

Członkiem tej podrodziny jest CIITA (*class II transactivator*). Oprócz charakterystycznych dla rodziny NLR domen, białko to zawiera ponadto domenę AD (*transactivator domain*), która odpowiada za funkcję tego receptora (rys. 4).

Rys. 4. Domeny funkcjonalne receptora CIITA- (objaśnienia w tekście)

CIITA jest głównym regulatorem cząsteczek MHC klasy II (*major histocompatibility complex class II*) zarówno typu konstytutywnego jak i indukowanego, oraz innych genów związanych z prezentacją antygenu. Konstytutywna ekspresja MHC II ogranicza się jedynie do grupy komórek prezentujących antygen (APC): limfocytów B i komórek dendrytycznych. Ekspresja indukowana może być wywołana w wielu różnych typach komórek, głównie przez interferon γ (IFNγ). Białko CIITA jest niewiążącym się z DNA ko-aktywatorem transkrypcyjnym, niezbędnym do ekspresji genów kodujących łańcuchy α i β we wszystkich klasycznych i nieklasycznych cząsteczkach MHC klasy II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DM, HLA-DO). Ponadto CIITA przyczynia się do transkrypcji genów MHC klasy I, ale w znacznie mniejszym stopniu. CIITA może także modulować odpowiedź immunologiczną

poprzez tłumienie transkrypcji innych genów, w tym genów dla IL-4, kolagenu α2 oraz ligandu Fas (FasL – ligand receptora śmierci Fas) [36,49,71].

2.4. Podrodzina NLRB

Przy okazji poszukiwania genetycznej przyczyny zaburzeń neurodegeneracyjnych u chorych na rdzeniowy zanik mięśni odkryto neuronalne białko hamujące apoptozę (NAIP, *neuronal apoptosis inhibitory protein*), zaliczono je do podrodziny NLRB [33, 70]. Charakterystyczną cechą podrodziny NAIP jest obecność na jego N-końcu domeny BIR (*baculoviral inhibitory repeat*). Domena ta jest silnym inhibitorem kaspaz efektorowych (szczególne kaspazy 3 i kaspazy 7) dzięki temu wywołuje efekt antyapoptotyczny. Obecna na C-końcu białka NAIP domena LRR sprawia, że białko jest zaangażowane w odpowiedź zapalną poprzez włączenie kaspazy 1 (rys. 5) [23, 41, 43].

Rys. 5. Domeny funkcjonalne receptora NAIP- (objaśnienia w tekście)

2.5. Podrodzina NLRX

Podrodzina NLRX (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing X1*) składa się obecnie tylko z jednego przedstawiciela NLRX1, znanego również, jako NOD9. Białko zachowując strukturę receptorów NLR, w swej centralnej części posiada domenę NBD-oligomeryzacji receptora oraz C-końcową domenę LRR [41]. Jej N-końcowa domena nie wykazuje natomiast homologii z którąkolwiek z pozostałych czterech podgrup (rys. 6).

Rys. 6. Domeny funkcjonalne receptora NLRX1- (objaśnienia w tekście)

Lokalizacja NLRX1 wydaje się być ograniczona do okolic mitochondriów [47, 62]. Funkcjonalnie białko NLRX1 okazało się być negatywnym regulatorem odpowiedzi przeciwwirusowej, zależnej od RIG-I (*retinoicacid-inducible gene 1*). NLRX1 poprzez połączenie się z mitochondrialnym białkiem MAVS (*mitochondria antiviral sygnaling protein*) uniemożliwia interakcje z receptorem RIG-I. Wykazano, że NLRX1 hamuje fosforylację IKK (*IκB kinase*), a poprzez to ma negatywny wpływ, na zależne od TLR uwalnianie czynnika transkrypcyjnego NF-κB [69]. NLRX1 okazuje się być również aktywatorem wytwarzania ROS dzięki temu pośrednio wzmacnia sygnalizację zależną od NF-κB. Produkcja ROS jest synergistycznie wzmacniana poprzez TNFα, infekcję bakterią *Shigella* oraz dwuniciowy RNA, a to powoduje wzmocnienie sygnału zależnego od NF-κB. Funkcja NLRX1 wskazuje na związek pomiędzy wytwarzaniem ROS w mitochondriach a wrodzonymi reakcjami odpornościowymi [62].

3. Udział NLR w tworzeniu platform molekularnych-inflamasomów

Pojęcie inflamasomu wprowadził w 2002 roku T s c h o p p i wsp. [45]. Inflamasomy są to wielobiałkowe komplesy, które mogą być tworzone przez NLRP1, NLRP3 i NLRC4 (IPAF), członków rodziny NLR. Najlepiej poznanym inflamasomem jest kompleks związany z NLRP3, który jest zdolny do wykrywania szerokiego wachlarza sygnałów alarmowych wzorców molekularnych związanych z patogenami, cząsteczek nieinfekcyjnych, a nawet takich czynników jak azbest i krzemionka [14]. Ostatnio [14] wykryto, że do utworzenia inflamasomu z udziałem NLRP3, niezbędne są wolne rodniki tlenowe, oraz obecność struktur siateczki endoplazmatycznej (ER) i mitochondriów. Spoczynkowa forma NLRP3 jest zlokalizowana przy błonach ER, jednak gdy następuje aktywacja inflamasomu, NLRP3 ulega przemieszczeniu do regionu jądra komórkowego, gdzie wraz z innymi składowymi inflamasomu kontaktuje się z ER i mitochondrium. Zarówno produkcja ROS jak i aktywacja inflamasomu są hamowane podczas zaburzeń funkcji mitochondriów. Dane te wskazują, że inflamasom z udziałem NLRP3 jest wrażliwy na dysfunkcję mitochondriów co może wyjaśniać często spotykany związek uszkodzenia mitochondriów w chorobach zapalnych [73].

Ekspresję inflamasomowych białek można znaleźć w komórkach odpornościowych monocytach, makrofagach, limfocytach T, miofibroblastach, fibroblastach, keratynocytach, komórkach nabłonkowych, oraz komórkach gwiaździstych wątroby [8]. Inflamasomy mogą być aktywowane poprzez antygeny bakteryjne jak również podczas zaburzeń metabolicznych [64]. Aktywny inflamasom oddziałuje z prokaspazą 1 za pośrednictwem domeny CARD przekształcając ją w jej aktywną formę – kaspazy 1. Różne inflamasomy są zdolne do aktywacji różnych kaspaz min. kaspazy 1, kaspazy 4, kaspazy 5. Uważa się, że to aktywacja kaspazy 1 ma najistotniejszy wpływ na funkcjonowanie inflamasomu. Aktywacja kaspazy 1 prowadzi do co najmniej dwóch odpowiedzi przeciw wewnątrzkomórkowym patogenom takim jak *Salmonella*, *Shigella* i *Burkholderia.* Jedną z nich jest przekształcenie pro-IL-1β oraz pro-IL-18 w ich aktywne, wydzielnicze formy IL-1β, IL-18. Drugą odpowiedzią jest indukcja śmierci komórki na drodze pyroptozy [9].

Tabela III

Skutek zmienności genetycznej w obrębie ludzkich genów receptorów NLR

Receptor	Rodzaj ustalonych zmienności genetycznych	Skutek zmienności genetycznej	Piśmiennictwo
NLRP1	**Występowanie SNP** SNP rs6502867 SNP rs2670660	Zwiększenie podatności na rozwój bielactwa	[27]
NLRP7	**Potranskrypcyjne modyfikacje** – pojawienie się jednego z wariantów transkrypcyjnych **Mutacje** p.Glu99X p.Asp657Val	Rozwój nasieniaka jądra Rozwój zaśniadu groniastego	[55] [51]
NLRP14	**Mutacje** p.Lys108X p.Asp86Val p.Ala375Thr p.Asp522Gln p.Met1019Ile	Zaburzenia w spermatogenezie	[66]
NOD1	Obniżony poziom ekspresji **Polimorfizmy** Cys2722 Thr2104	Zwiększona podatność na sarkoidozę Zwiększona podatność na choroby alergiczne	[61]
NOD2	**Mutacje domeny LRR** Arg702Trp Gly908Arg Leu1007fsinsCys **Mutacje domeny NBD** 334Gln 334Trp Leu469Phe	Zwiększona podatnośc na chorobę Crohna Zwiększona podatnośc na chorobę Blau'a	[38] [45]

4. Choroby wywołane mutacjami w genach NLR

Fizjologiczne znaczenie różnych NLR polega na obronie gospodarza przed zakażeniami bakteryjnymi. Coraz częściej receptorom tym przypisuje się rolę utrzymywania homeostazy narządów. Jest to uzasadnione ze względu na fakt, że wiele zapalnych i niezapalnych procesów chorobowych ma swe podłoże w defektywnej sygnalizacji NLR, spowodowanej mutacjami w obrębie ich genów. Dowiedziono, że zaburzenia funkcji NOD1 i NOD2, spowodowane mutacją ich genów mogą przyczyniać się do patogenezy zapalnych chorób jelit [5, 63, 66, 74]. Ustalone mutacje genetyczne i ich konsekwencje przedstawiono w tabeli III.

4.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna

Choroba Leśniowskiego-Crohna (CD) jest zapalną chorobą jelit o niejasnej etiologii zaliczana do grupy nieswoistych zapalań jelit (IBD). Podczas badań wśród rodzin dotkniętych CD zidentyfikowano region ryzyka dla tej choroby, którym okazał się być gen *CARD15* dla NOD2 [7, 19, 26, 51].

W obrębie tego genu wykryto wiele polimorfizmów, spośród których trzy okazują się mieć istotny związek z podatnością na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Polimorfizmami tymi są: Arg702Trp, Gly908Arg oraz Leu1007fsinsCys. Mutacje Arg702Trp i Gly908Arg dotyczą pojedynczych zmian aminokwasów w obrębie domeny LRR natomiast mutacja Leu1007fsinsCys spowodowana jest delecją powodującą przesunięcie ramy odczytu co skutkuje brakiem 33 aminokwasów w produkcie białkowym [39].

Ryzyko występowania choroby Leśniowskiego-Crohna jest uzależnione od tego czy dana osoba jest homo- czy heterozygotą. W przypadku homozygot ryzyko wzrasta 40-krotnie, natomiast heterozygoty mają tylko 2–4-krotny wzrost ryzyka. U części homozygot choroba przebiegała bezobjawowo przez 10–15 lat, co nasuwa wniosek, że na rozwój choroby oprócz mutacji w genie *CARD15*, mają również wpływ inne czynniki genetyczne, a także środowiskowe [16]. Istnieją również doniesienia, że rodzaj mutacji warunkuje lokalizację choroby Leśniowskiego-Crohna. Przykładowo u homomozygot Leu1007fs choroba jest związana z umiejscowieniem żołądkowo-dwunastniczym, i ujawnieniem się w młodszym wieku [44].

4.2. Choroba Blau'a

Choroba Blau'a to rzadka choroba autosomalnie dominująca, która podobnie jak CD jest związana z defektem w obrębie genu *CARD15*. Charakteryzuje ją: wczesny początek choroby ziarniniakowej, zapalenie stawów, zapalenie tęczówki oraz wysypka skórna [4]. Z chorobą Blau'a związane są mutacje w obrębie NOD2, obejmujące domenę NBD np. 334Gln, Arg334Trp i Leu-469Phe [46]. Mutacje w obrębie domeny NBD mogą powodować zaburzenia procesu oligomeryzacji, niezbędnej do aktywacji receptora NOD2. Mutacje te dodatkowo przyczyniają się do wzmocnienia funkcji i stałej aktywacji NF-κB nawet przy braku stymulacji MDP [10,61]. Powyższe dane stały się podstawą hipotezy, że jest to choroba o podłożu autoimmunologicznym.

4.3. Zespół okresowej gorączki

Zespół okresowej gorączki (*Cryopyrin-associated periodic fever syndrome* – CAPS) jest rzadką chorobą, dziedziczoną autosomalnie dominująco, spowodowaną mutacjami w genie *NLRP3* (znanym również jako *CIAS1*). NLRP3 jest częścią inflamasomu, aktywującego kaspazę 1. Kaspaza 1 katalizuje przekształcenie pro-IL-1β do IL-1β, co powoduje uruchomienie przewlekłych reakcji zapalnych. U chorych z CAPS poziom IL-1β jest pięciokrotnie wyższy niż u osób zdrowych. CAPS obejmuje trzy nakładające się klinicznie zaburzenia: zespół Muckle-Wells'a (MWS), dnę moczanową i wielonarządową chorobę zapalną noworodków (*neonatal-onset multisystem inflammatory disorder,* NOMID) [48].

4.4. Sarkoidoza

Sarkoidoza jest zaburzeniem autoimmunologicznym charakteryzującym się występowaniem ziarniniaków (małych grudek zapalnych), niepodlegających martwicy. Najczęściej zaatakowane są płuca i węzły chłonne. Zwiększoną podatnością na tę chorobę wykazują osoby z obniżoną ekspresją NOD1 i obniżoną aktywacją NF-κB w odpowiedzi zarówno na iEDAP i zakażenie *Propionibacterium acnes* [51].

K a n a z a w a i wsp. [31] opisali związek NOD2 z młodzieńczą postacią sarkoidozy (*juvenile-onset-sarcoid,* EOS). W grupie badawczej składającej się 10 japońskich pacjentów z rozpoznaniem EOS, dziewięciu miało heterozygotyczne mutacje zmiany sensu w genie *CARD15,* w regionie kodującym domenę NBD.

4.5. Choroby alergiczne

Niektóre warianty genetyczne NOD1 są związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia astmy i atopowego zapalenia skóry. U dzieci z polimorfizmem Cys2722 zaobserwowano wzrost ryzyka rozwoju alergicznego nieżytu nosa oraz zwiększone ryzyko wystąpienia atopowego zapalenia skóry. Ponadto, występowanie allelu Thr2104 wiązało się z niemal 2-krotnym ryzykiem alergicznego nieżytu nosa. W przypadku insercji Cys w pozycji 3020 ryzyko atopii wzrastało o 50%, a stężenie IgE w surowicy były podwyższone [29]. G i a r d i n i wsp. [22] opisali, że mutacje w NOD1 są związane ze zwiększoną podatnością na astmę i zapalenie jelit. W obu przypadkach, stwierdzono, że mutacje, uwarunkowane są insercyjno-delecyjnym polimorfizmem o obrębie dziewiątego intronu genu *CARD4*. Badania wykazały, że powstałe w wyniku mutacji warianty NOD1 różnią się poziomem ekspresji. W tkankach prawidłowych, istnieją izoformy NOD1, które łatwo wykryć, ze względu na różnice w długości ich domeny LRR. Mimo obecności tych izoform zdolność aktywacji NF-κB jest podobna jak w przypadku formy o pełnej długości NOD1. Wyniki te sugerują, że na poziomie fizjologicznym, warianty NOD1 mogą przyczynić się do regulacji ekspresji NF-κB indukowanej przez cząsteczki o pełnej długości, natomiast w chorobach takich jak astma czy zapalenie jelit, ekspresja tych izoform wydaje być zmieniana, co może prowadzić do nieprawidłowych reakcji zapalnych.

4.6. Zespół nagich limfocytów

Zespół nagich limfocytów (*bare lymphocytic syndrome,* BLS) jest chorobą autosomalnie recesywną charakteryzującą się wrodzonym niedoborem odporności. Osoby dotknięte tą jednostką chorobową są bardzo podatne na zakażenia, które są spowodowane wadami w odporności komórkowej i humoralnej, a także z uszkodzeniami głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II). Mutacje w obrębie genu dla receptora CIITA, przyczyniają się do zaburzenia jego funkcji, a także powodują obniżenie liczebności limfocytów T CD4+ [11].

4.7. Niepowodzenia rozrodu

Receptorem odgrywającym ważną rolę w rozwoju płodu jest członek podrodziny NLRP, białko-NLRP7. Stwierdzono, że mutacja w genie tego receptora u ludzi, wiąże się z nawrotem zaśniadu groniastego, samoistnymi poronieniami, martwymi urodzeniami i opóźnionym wewnątrzmacicznym wzrostem płodu. Z kolei nadekspresja jednego z warianów *NLRP7* jest związana z rozwojem nasieniaka jąder u mężczyzn [52].

Mutacje w genie *NLRP14* innego członka tej podrodziny zostały wykryte u 5 spośród 157 mężczyzn z azoospermią lub ciężką oligozoospermią. Wysoką ekspresję genów *NLRP2* i *NLRP7* wykazano w ludzkich oocytach i zarodkach [72].

4.8. Bielactwo

Bielactwo jest chorobą autoimmunologiczną, w przebiegu której niszczeniu ulegają melanocyty naskórka, skutkiem czego następuje depigmentacja skóry w postaci płatów. Osoby z bielactwem częściej zapadają na schorzenia autoimmunologiczne. W badaniach nad populacją kaukaską wykryto związek pomiędzy bielactwem a wariantami NLRP1. Wśród tych osób wykryto allele wysokiego ryzyka, którym były polimorfizmy pojedynczych nukleotydów miejsc restrykcyjnych (*single nucleotide polymprphism restriction sites*) SNP rs6502867 i SNP rs2670660 [28].

1. Podsumowanie

Identyfikacja i charakterystyka receptorów NLR dowodzą, że białka te rozpoznają konserwatywne cząsteczki drobnoustrojów i aktywują poszczególne szlaki przekazywania sygnałów włączając w to aktywację NF-κB, MAPK i kaspazę 1.Aktywacja receptorów NOD1 i NOD2 prowadzi do aktywacji NF-κB podczas gdy inne receptory NLR tworzą duże wewnątrzkomórkowe kompleksy określane jako inflamasomy, które aktywują kaspazę 1 do rozszczepienia pro-IL-1β, dzięki czemu aktywna IL-1β może być uwalniana poza komórkę. W tym aspekcie sygnalizacja z receptorów NLR jest komplementarna do sygnalizacji TLR. Deregulacja sygnalizacji NLR może prowadzić do wzmocnienia lub utraty fenotypowej funkcji, które u człowieka skutkują chorobami. Udział NLR w patogenezie niektórych chorób genetycznych wskazuje, że odgrywają one ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Zapalenie jelit jest głównie związane z mutacjami w obrębie genu NOD2, zaś grupa chorób autoimmunologicznych z mutacją w genie NLRP3 i nadmierną sygnalizacją IL-1β. Nadmierna produkcja IL-1β jest związana z przypadkami rodzinnych chorób zapalnych takich jak zespół Muckle-Wells'a, wielonarządową chorobą zapalną noworodków oraz dną moczanową.

Udowodniono, że receptory te mają wpływ na homeostazę jelitową w tym regulację składu mikroflory jelitowej, utrzymanie bariery nabłonkowej oraz regulację autofagii. Ujawniono również związek między NLR a nowotworzeniem [13]. Istnieją jednak liczne rozbieżności informacyjne zależne od modelu badawczego. Oczywiste różnice występują w kontroli homeostazy jelitowej u myszy i ludzi.

Aby jednak lepiej zrozumieć mechanizmy, dzięki którym mutacje w obrębie genów NLR można skojarzyć z podatnością na konkretne choroby zapalne, konieczne są dalsze badania, których wyniki mogą przyczynić się do racjonalnych terapii.

Piśmiennictwo

1. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783–801 (2006)
2. Anand P.K., Malireddi R.K., Luknes J.R., Vogel P., Bertin J., Lamknanf M., Kanneganti T.D.: NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature*, **488**, 389–393 (2012)
3. Benko S., Philpott D.J., Girardin S.E.: The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine*, **43**, 368–373 (2008)
4. Blau E.B.: Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *J. Pediatr.* **107**, 689–693 (1985)
5. Boughan P.K., Bajaj-Elliott M. i wsp.: Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of β-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J. Biol. Chem.* **281**, 11637–11648 (2006)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
6. Carneiro L.A., Magalhaes J.G., Tattoli I., Philpott D.J., Travassos L.H.: Nod-like proteins in inflammation and disease. *J. Pathol.* **214**, 136–148 (2008)
7. Carneiro L.A., Travassos L.H., Philpott D.J.: Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect*. **6**, 609–616 (2004)
8. Artlett C.M.: The role of the NLRP3 inflammasome in fibrosis. *Open Rheumatol. J.* **6**, 80–86 (2012)
9. Ceballos-Olvera I., Sahoo M., Miller M.A., Del Barrio L., Re F.: Inflammasome-dependent pyroptosis and IL-18 protect against *Burkholderia pseudomallei* lung infection while IL-1β is deleterious. *PLoS Pathog.* **7**, 1–13 (2011)
10. Chamaillard M., Thomas G. i wsp.: Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3455-3460 (2003)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
11. Chen G., Shaw M.H., Kim Y.G., Nuñez G.: Nod-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 365–398 (2009)
12. Creagh E.M., O'Neill L.A.: TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* **27**, 352–357 (2006)
13. Da Silva Correia J., Miranda Y., Austin-Brown N., Hsu J., Mathison J., Xianq R., Zhou H., Li Q., Han J., Ulevitch R.J.: Nod1-dependent control of tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**,1840–1845 (2006)
14. Dostert C., Pétrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T., Tschopp J.: Innate immune activation through NALP3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, **320**, 674–677 (2008)
15. D'Osualdo A., Weichenberger C.X., Wagner R.N., Godzik A., Wooley J., Reed J.C.: CARD8 and NLRP1 undergo autoproteolytic processing through a ZU5-like domain. *PLoS One*, **6**, 1–8 (2011)
16. Eckmann L., Karin M.: NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity.* **22**, 661–667 (2005)
17. Eisenbarth S.C., Flavell R.A. i wsp.: NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature*, **484**, 510–513 (2012)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
18. Fakuta M., Vamadevan A.S., Abreu M.T.: Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin. Immunol*. **21**, 242-253 (2009)
19. Fernandez L., Mendoza J.L., Martinez A., Urcelay E., Fernandez-Arquero M., Garcia-Paredes J., Peña A.S., Diaz-Rubio M., De la Concha E.G.: IBD1 and IBD3 determine location of

Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm. Bowel Dis.* **10**, 715–722 (2004)
20. Ferrand J., Ferrero R.L., Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs nad Its Role in the Development of Adaptive Immunity. *Fort. Immunol*. **4**, 344 (2013)
21. Franchi L., McDonald C., Kanneganti T.D., Amer A., Nuñez G.: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J. Immunol.* **177**, 3507–3513 (2006)
22. Girardin S.E., Jéhanno M., Mengin-Lecreulx D., Sansonetti P.J., Alzari P.M., Philpott D.J.: Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem*. **18**, 38648–38656 (2005)
23. Herman M.D., Moche M., Flodin S., Welin M., Trésaugues L., Johansson I., Nilsson M., Nordlund P., Nyman T.: Structures of BIR domains from human NAIP and cIAP2. *Acta Crystalogr.* **65**, 1091–1096 (2009)
24. Hiscott J., Lin R., Nakhaei P., Paz S.: MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol. Med.* **12**, 53–56 (2006)
25. Homer C.R., Richmond A.L., Rebert N.A., Achkar J.P., McDonald C.: ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy--dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*, **139**, 1630–1641 (2010)
26. Hugot J.P., Thomas G. i wsp.: Association of NOD2 leucine rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 599–603 (2001)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 20 autorów)
27. Inohara N., Nuñez G. i wsp.: Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-κB. *J. Biol. Chem*. **274**, 14560–14567 (1999)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 20 autorów)
28. Jin Y., Birlea S.A., Fain P.R., Spritz R.A.: Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2558–2562 (2007)
29. Kabesch M., Peters W., Carr D., Leupold W., Weiland S.K., Von Mutius E.: Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 813–817 (2003)
30. Kanazawa N., Miyachi Y. i wsp.: Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations with constitutive nuclear factor-kappa B activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*, **105**, 1195–1197 (2005)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 19 autorów)
31. Kanneganti T.D., Lamkanfi M., Nuñez G.: Intracellular NOD--like receptors in host defense and disease. *Immunity*, **27**, 549–559 (2007)
32. Kersse K., Bertrand M.J., Lamkanfi M., Vandenabeele P.: NOD--like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 257–276 (2011)
33. Kędziora S., Słotwiński R.: Molekularne mechanizmy towarzyszące rozpoznawaniu patogenu przez receptory wrodzonej odporności. *Post. Hig. Med. Dośw.* **63**, 30-38 (2009)
34. Khare S., Dorfleutner A., Bryan N.B., Yun C., Radian A.D., de Almedia L., RojanasakulY., Stehlik C.: NLRP7-Containing Inflamasome Mediates Recognition of microbal Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity*, **36**, 464–476 (2012)
35. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Nuñez G.: The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll--like receptor ligands. *Immunity*, **28**, 246–257 (2008)
36. Krawczyk M., Seguín-Estévez Q., Leimgruber E., Sperisen P., Schmid C., Bucher P., Reith W.: Identification of CIITA regulated genetic module dedicated for antigen presentation. *PLoS Genetics*, **4**, 1-16 (2008)
37. Kufer T.A., Kremmer E., Adam A.C., Philpott D.J., Sansonetti P.J.: The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell. Microbiol.* **10**, 477–486 (2008)
38. Lee M.S., Kim Y.J.: Signaling pathways downstream of pattern--recognition Receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 447–480 (2007)
39. Lesage S., Hugot J.P. i wsp.: CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 845–857 (2002)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 19 autorów)
40. Lipinski S., Till A., Sina C., Arlt A., Grasberger H., Schreiber S., Rosenstiel P.: DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J. Cell Sci.* **122**, 3522–3530 (2009)
41. Liston P., Korneluk R.G. i wsp. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, **379**, 349–353 (1996)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
42. Magalhaes J.G., Sorbara M.T., Girardin S.E., Philpott D.J.: What is new with Nods? *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 29–34 (2011)
43. Maier J.K., MacKenzie A.E. i wsp.: The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J. Neurosci.* **22**, 2035–2043 (2002)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
44. Mardini H.E., Gregory K.J., Nasser M., Selby L., Arsenescu R., Winter T.A., De Villiers W.J.: Gastroduodenal Crohn's disease is associated with NOD2/CARD15 gene polymorphism, particulary L1007P homozygosity. *Dig. Dis. Sci.* **50**, 2316–2322 (2005)
45. Martinon F., Burns K., Tschopp J.: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-β. *Mol. Cell.* **10**, 417–426 (2002)
46. Miceli-Richard C., Lesage S., Rybojad M., Prieur A.M., Manouvrier-Hanu S., Häfner R., Chamaillard M., Zouali H., Thomas G., Hugot J.P.: CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat. Genet.* **29**, 19–20 (2001)
47. Moore C.B., Bergstralh D.T., Duncan J.A.: NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*, **451**, 573–579 (2008)
48. Mueller S.M., Itin P., Haeusermann P.: Muckle-Wells syndrome effectively treated with canakinumab: is the recommended dosing schedule mandatory? *Dermatology*, **223**, 113–118 (2011)
49. Muhlethaler-Mottet A., Otten L.A., Steimle V., Mach B.: Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* **16**, 2851–2860 (1997)
50. Neerincx A., Castro W., Guarda G., Kufer T.A.: NLRC5, at the Heart of Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **4**, 397 (2013)
51. Ogura Y., Cho J.H. i wsp.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 603–606 (2001)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
52. Okada K., Hirota E., Mizutani Y., Fujioka T., Shuin T., Miki T., Nakamura Y., Katagiri T.: Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. *Cancer Sci.* **95**, 949–954 (2004)
53. Pontillo A., Catamo E., Arosio B., Mari D., Crovella S.: NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **26**, 277-281 (2012)
54. Poyet J.L., Srinivasula S.M., Tnani M., Razmara M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S.: Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 28309–28313 (2001)

55. Proell M., Riedl S.J., Fritz J.H., Rojas A.M., Schwarzenbacher R.: The Nod-like receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences. *PLoS One*, **3**, 1–11 (2008)
56. Qian J., Deveault C., Bagga R., Xie X., Slim R.: Women heterozygous for NALP7/NLRP7 mutations are at risk for reproductive wastage: report of two novel mutations. *Hum. Mutat.* **28**, 741 (2007)
57. Schneider M, Ting J.P. i wsp.: The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-κB. *Nat. Immunol.* **13**, 823–831 (2012)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
58. Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Chen Z.J.: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kB and IRF3. *Cell*, **122**, 669–682 (2005)
59. Shin O.S., Harris J.B.: Innate immunity and transplantation tolerance: the potential role of TLRs/NLRs in GVHD. *Korean J. Hematol.* **46**, 69–79 (2011)
60. Tanabe T., Nuñez G. i wsp.: Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* **23**, 1587–1597 (2004)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
61. Tanabe T., Eishi Y. i wsp.: Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 794–801 (2006)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
62. Tattoli I., Carneiro L.A., Jéhanno M., Magalhaes J.G., Shu Y., Philpott D.J., Arnoult D., Girardin S.E.: NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-κB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep.* **9**, 293–300 (2008)
63. Ting J.P., Ward P.A. i wsp.: The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*, **28**, 285–287 (2008)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
64. Tschopp J., Schroder K.: NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signaling pathways on ROS production. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 210-215 (2010)
65. Uehara A., Fujimoto Y., Fukase K., Takada H.: Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce antimicrobial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* **44**, 3100–3111 (2007)
66. Voss E., Wehkamp J., Wehkamp K., Stange E.F., Schröder J.M., Harder J.: NOD2/CARD15 mediates induction of the anti^{+} microbial peptide human β-defensin-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 2005–2011 (2006)
67. Westerveld G.H., Korver C.M., Van Pelt A.M., Leschot N.J., Van der Veen F., Repping S., Lombardi M.P.: Mutations in the testis-specific *NALP14* gene in men suffering from spermatogenic failure. *Hum. Reprod.* **21**, 3178–3184 (2006)
68. Wickner W.: Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J.* **21**, 1241–1247 (2002)
69. Xia X., Wang R.F. i wsp.: NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF-κB signaling by targeting TRAF6 and IKK. *Immunity*, **34**, 843-853 (2011)
(wyżej cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
70. Ye Z., Ting J.P.: NLR, the nucleotide-binding domain leucine--rich repeat containing gene family. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 3–9 (2008)
71. Yee C.S., Yao Y., Li P., Klemsz M.J., Blum J.S., Chang C.H.: Cathepsin E: a novel target for regulation by class II transactivator. *J. Immunol.* **172**, 5528–5534 (2004)
72. Zhang P., Dixon M., Zucchelli M., Hambiliki F., Levkov L., Hovatta O., Kere J.: Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development. *PLoS One*, **3**, 1–8 (2008)
73. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J.: A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, **469**, 221–225 (2011)
74. Zilbauer M., Dorrell N., Elmi A., Lindley K.J., Schüller S., Jones H.E., Klein N.J., Núnez G., Wren B.W., Bajaj-Elliott M.: A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.* **9**, 2404–2416 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 15–24
http://www.pm.microbiology.pl

PRZEMYSŁOWE WYKORZYSTANIE BAKTERII Z RODZAJU *CLOSTRIDIUM*

Katarzyna Leja[1]*, Katarzyna Czaczyk[1], Kamila Myszka[1]

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, Poland

Wpłynęło w listopadzie 2013 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Clostridium.* 2.1. Morfologia, hodowla i metabolizm. 2.2. Chorobotwórczość. 3. Przemysłowe wykorzystanie *Clostridium* spp. 3.1. Biosynteza acetonu, butanolu i innych rozpuszczalników. 3.2. Synteza 1,3-propanodiolu. 3.3. Produkcja kwasów. 3.4. Produkcja wodoru. 3.5. Inne metabolity. 4.Wykorzystanie bakterii z rodzaju *Clostridium* w medycynie i kosmetyce. 5. Podsumowanie

Industrial Application of *Clostridium* spp.

Abstract: Bacteria of the genus *Clostridium* are often described only as being a biological threat and a foe of mankind. It is true that within the more than 150 validly described clostridial species of this heterogeneous genus, there are some that produce the most potent natural toxins known on earth. However, there is no much information about positive properties and possibility to use *Clostridium* strains in many industry branches, in medicine, and cosmetology. The modern biotechnology make possible to use the dangerous toxins as a valuable tools in the treatment of severe disease. It is one of the aims of this article to show that using definition "bad clostridia" is mistaken.

1. Introduction. 2. Characterization of *Clostridium* genera. 2.1. Morphology, cultivation and metabolism. 2.2. Pathogenicity. 3. Industrial Application of *Clostridium* spp. 3.1. Acetone, butanol and other solvents biosynthesis. 3.2. 1,3-propanodiol biosynthesis. 3.3. Acids production. 3.4. Hydrogen production. 3.5. Other metabolites. 4. Application of *Clostridium* spp. in medicine and cosmetology. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: aceton, butanol, *Clostridium* spp., medycyna estetyczna, terapia nowotworów, 1,3-propanodiol
Key words: acetate, aesthetic medicine, butanol, cancer treatment, *Clostridium* spp., 1,3-propanediol

1. Wstęp

Pierwsze doniesienie dotyczące klostridiów pojawiło się już ok. roku 430–370 przed naszą erą. Hipokrates opisał w swojej książce *Epidemie III* (*Epidemics III*) chorobę, która diagnozowana była jako zgorzel gazowa. Wywoływana była ona przez *Clostridium histolyticum* [66]. Do jej objawów należały gorączka oraz obrzęk skóry w kolorze żółtawo-czerwonym. W niektórych przypadkach dochodziło do utraty kończyn. Takie same objawy uzyskano w późniejszych eksperymentach na zwierzętach zainfekowanych *Cl. histolyticum*. Pierwszy opis innej choroby powodowanej przez bakterie należące do *Clostridium* spp. – tężca – pojawił się natomiast w roku 1824 w *Esseys on the Anatomy and Philosophy of Expression* Charlesa Bella [66]. Jednakże rozpoznanie klostridiów jako odrębnej grupy mikroorganizmów zapoczątkowała praca Louisa Pasteura. W 1861 roku opisał on mikroorganizm zdolny do wzrostu bez obecności tlenu. W tamtych czasach było to ogromną sensacją. Pasteur nazwał tę bakterię *Vibrion butyrique* ze względu na główny produkt fermentacji – maślan i wprowadził termin „beztlenowy" dla określania życia bez wolnego tlenu. Organizm ten został 20 lat później nazwany *Clostridium butyricum* przez polskiego mikrobiologa Adama Prażmowskiego [25].

Bakterie z rodzaju *Clostridium* występują w środowisku naturalnym bardzo powszechnie, są obecne między innymi w kurzu, glebie, wodzie, osadach dennych oraz przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [70]. Znane są przede wszystkim ze swojej chorobotwórczości. Warto zwrócić także uwagę na możliwość wykorzystania gatunków z tego rodzaju w przemyśle. Duża aktywność biochemiczna *Clostridium* sp. wynika z tego, że produkują one liczne enzymy zewnątrzkomórkowe. Bakterie należące do tego rodzaju są zdolne do fermentacji składników organicznych i produkcji dużych ilości dwutlenku węgla, wodoru, kwasów organicznych, butanolu, acetonu i innych składników. Klostridia niebędące patogenami wykazują duży potencjał przemysłowy. Stosowane są między innymi do produkcji kwasu masłowego, niektórych rozpuszczalników (m.in. butanolu, acetonu i izopropanolu) oraz wodoru [14]. Wykorzystywane są także w medycynie. W ciągu ostatniego dziesięciolecia znacznie wzrosło zainteresowanie *Cl. botulinum* i *Cl. tetani*. Prowadzone są intensywne badania nad strukturą, fizjologią oraz biochemią neurotoksyn wytwarzanych przez te bakterie [12, 53, 77, 80], jak również nad wykorzystaniem kompleksu toksyn

* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; e-mail: katleja@up.poznan.pl

botulinowych jako czynników terapeutycznych w leczeniu chorób u ludzi [13, 22, 39]. W literaturze pojawiają się także informacje dotyczące produkcji bakteriocyn przez takie szczepy jak między innymi *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum*, *Cl. botulinum* [26], *Cl. perfingens* i *Cl. acetobutylicum* [3, 18].

2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Clostridium*

2.1. Morfologia, hodowla i metabolizm

Komórki laseczek *Clostridium* są różnej wielkości, barwią się gramdodatnio lub gramzmiennie oraz tworzą przetrwalniki. Przetrwalniki są owalne lub kuliste. Kolonie tych laseczek są dość duże, płaskie, okrągłe lub owalne, brzeg mogą mieć równy lub postrzępiony, powierzchnię matową, szorstką, barwę szarawą do szarożółtawej. Długość komórek wynosi średnio 0,5–5 μm, a szerokość 0,3–2,0 μm. Kształt komórek bywa zmienny i uwarunkowany jest czynnikami środowiskami. Bakterie należące do tego rodzaju są beztlenowcami, nie wytwarzają katalazy [70]. Komórki są ruchliwe, urzęsione peritrichalnie. Optymalna temperatura wzrostu większości gatunków tego rodzaju mieści się między 30–40°C. Wśród klostridiów są również gatunki termofilne, dla których optymalna temperatura wzrostu wynosi 60 i 75°C. Gatunki te mają szczególne znaczenie w procesach przemysłowych i biotechnologicznych, ponieważ prowadzone przez nie procesy zachodzą szybko, a enzymy tych bakterii wykazują dużą stabilność. Wśród klostridiów znajdują się także gatunki, które nie wykazują typowych cech morfologicznych dla tego rodzaju. Należą do nich *Cl. coccoides*, które tworzą okrągłe komórki, *Cl. perfingens*, *Cl. leptum*, *Cl. barati* i *Cl. spiroforme,* u których nie wykryto przetrwalników, *Cl. tertium*, *Cl. carnis*, *Cl. histolyticum* i *Cl. intestinalis* wzrastające w warunkach tlenowych [85].

Klostridia wykazują intensywny metabolizm fermentacyjny, wykorzystując takie substraty jak monosacharydy, disacharydy i polisacharydy. Do głównych produktów fermentacji prowadzonej przez te bakterie należą kwas octowy, masłowy, mlekowy, mrówkowy, etanol, butanol, CO_2, H_2 i NH_3. Na tej podstawie bakterie te można podzielić na gatunki sacharolityczne, które fermentują głównie mono- i polisacharydy (m.in *Cl. cellobioparum*, *Cl. cellulovorans*, *Cl. butyricum*, *Cl. acetobutyricum*, *Cl. aceticum*, *Cl. stercorarium*) oraz proteolityczne fermentujące białka i aminokwasy (m.in. *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans*, *Cl. kluyveri*, *Cl. acidiurici*) [69].

2.2. Chorobotwórczość

Rodzaj *Clostridium* obejmuje ponad 100 gatunków. Wśród nich znajduje się około 35 gatunków patogennych wytwarzających egzotoksyny, między innymi *Cl. botulinum*, *Cl. perfingens*, *Cl. tetani*, *Cl. barati, Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi, Cl. septicum*, *Cl. chauvoei* oraz *Cl. difficile* [70].

Najbardziej znanym patogenem z rodzaju *Clostridium* jest *Cl. botulinum* powodujący botulizm. Chorobę tę można podzielić na 6 typów – botulizm pochodzenia pokarmowego, czyli klasyczny, botulizm przyranny, botulizm niemowląt, botulizm pochodzenia jelitowego dorosłych, botulizm inhalacyjny i botulizm jatrogenny. W Polsce, w 2004 roku zarejestrowano 53 przypadki botulizmu pochodzenia pokarmowego. Natomiast botulizm przyranny został po raz pierwszy opisany w 1951 roku. Od tego roku do końca lat 90. XX wieku ponad 90% zachorowań zostało rozpoznanych w USA. Od 1988 roku odnotowano duży wzrost liczby nowych przypadków wśród osób zażywających narkotyki w iniekcjach. Objawy kliniczne botulizmu przyrannego są takie same, jak zatrucia jadem kiełbasianym pochodzenia pokarmowego. Botulizm niemowląt jest następstwem połknięcia zarodników *Cl. botulinum*, które kiełkują tworząc formy wegetatywne zdolne do namnażania się i produkcji neurotoksyny botulinowej w świetle jelita grubego. Zachorowania występują począwszy od pierwszych dni życia [11, 70].

Cl. tetani wywołuje różne odmiany tężca (m.in. miejscowy oraz uogólniony). Zakażenie następuje podczas urazów penetrujących skażonych glebą, warunkujących rozwój beztlenowy – drobnoustrój zaczyna wydzielać toksynę, która drogą aksonalną dociera do rdzenia kręgowego, w którym zaburza działanie hamujące neuronów wstawkowych [11, 85].

Laseczki *Cl. difficile* są przyczyną szpitalnych zakażeń pokarmowych. Szczepy, które wykazują działanie chorobotwórcze wytwarzają dwie różne toksyny białkowe silną cytotoksynę oraz wywołującą biegunki enterotoksynę, które uwalniane są przez komórki wegetatywne. Bakterie te są także przyczyną 25% wszystkich biegunek rozwijających się po doustnym podaniu antybiotyków [11].

Bakterie *Cl. perfingens* wywołują zgorzel gazową oraz są powodem silnych zatruć pokarmowych związanych z uwalnianiem z komórek wegetatywnych enterotoksyn. W rozwoju zgorzeli gazowej uczestniczą także inne gatunki *Clostridium*, m.in. *Cl. novyi* i *Cl. septicum* [85].

3. Przemysłowe wykorzystanie *Clostridium* spp.

3.1. Biosynteza acetonu, butanolu i innych rozpuszczalników

Niektóre szczepy rodzaju Clostridium posiadają zdolność do produkcji substancji o wartościach rozpuszczalników. Są nimi aceton, butanol i etanol, między innymi *Cl. acetobutylicum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. beije-*

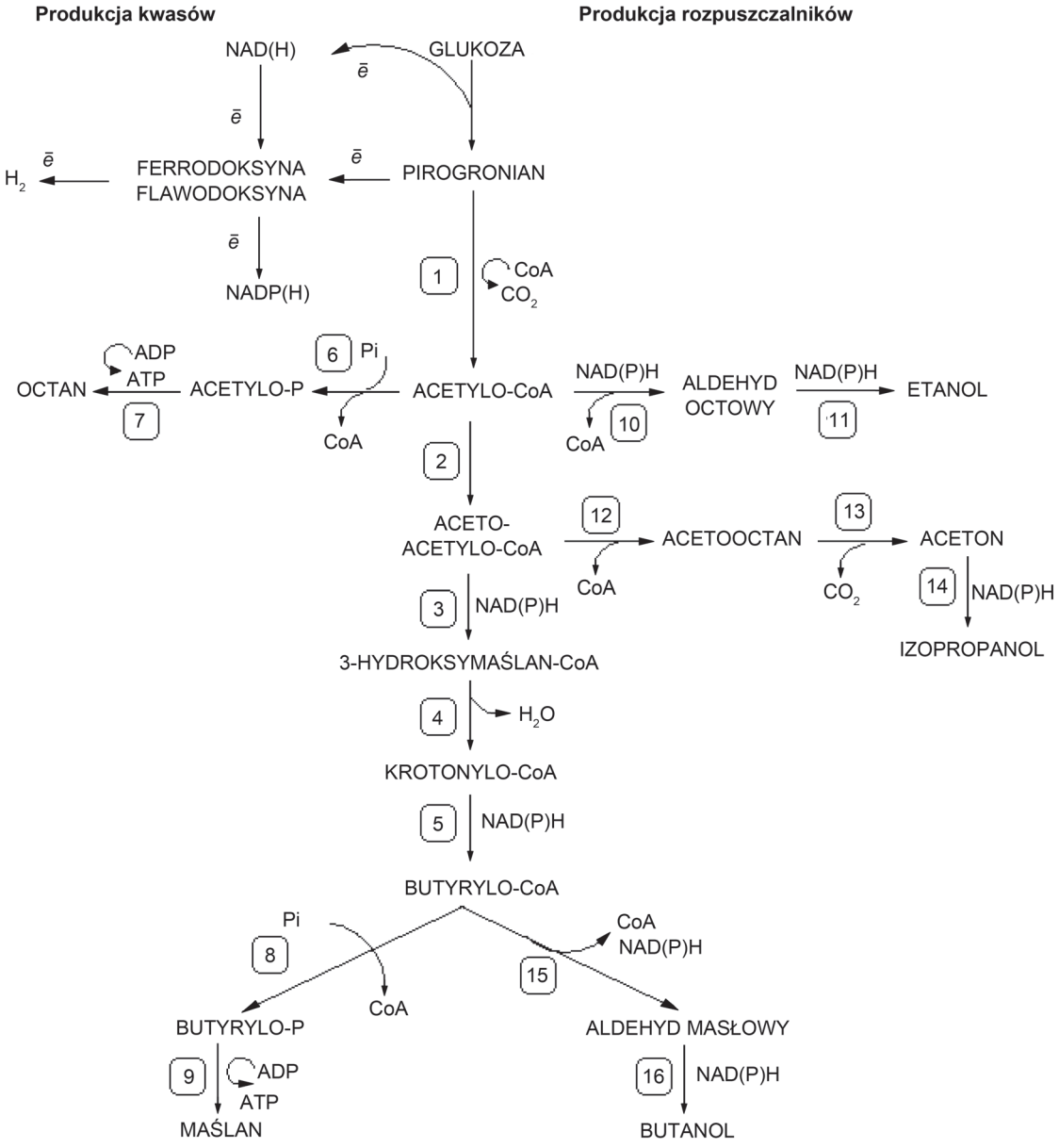
rinckii, *Cl. saccharoperbutylacetonicum* i *Cl. saccharobutylicum* [41, 48]. Najlepiej poznanym szczepem należącym do tej grupy jest *Cl. acetobutylicum*, a acetonowo-butanolowa fermentacja prowadzona przez te bakterie stanowiła przez długi czas podstawę dla produkcji tych rozpuszczalników na skalę przemysłową [2, 44]. Wśród *Cl. beijerinckii* znajdują się szczepy, które oprócz butanolu produkują także izopropanol [15, 30]. *Cl. pasteurianum* fermentuje natomiast węglowodory do butanolu, acetonu, dwutlenku węgla oraz cząsteczkowego wodoru [19, 34].

Produkcja acetonu, butanolu i etanolu poprzez fermentację stosowana jest od wielu lat. Szczególne zainteresowanie produkcją acetonu na drodze mikrobiologicznej zaobserwowano podczas I Wojny Światowej, ponieważ stosowany był on jako rozpuszczalnik nitrocelulozy [44]. Po wojnie znacznie spadło zainteresowanie produkcją acetonu, wzrosło natomiast zainteresowanie butanolem, ponieważ stosowany był on do syntezy octanu butylu, który z kolei wykorzystywany był jako rozpuszczalnik do lakierów samochodowych [24]. Jednakże, w latach 20. XX wieku proces produkcji wielu rozpuszczalników na drodze biotechnologicznej został zastąpiony metodami petrochemicznymi, a w latach 60. XX wieku fermentacja prowadzona przez *Clostridium* została całkowicie wyeliminowana z użycia w przemyśle. Powodem rezygnacji z tego procesu była niska produktywność wynikająca z wolnego przebiegu procesu, niewielkiej wydajności oraz wysokich kosztów odzyskiwania produktów (między innymi poprzez destylację). Obecnie zauważalna jest tendencja powrotu do produkcji rozpuszczalników metodą fermentacji. Wzrastająca troska o środowisko i konieczność uniezależnienia produkcji rozpuszczalników od surowców pochodzących z przemysłu petrochemicznego, spowodowały wzrost zainteresowania produkcją rozpuszczalników z surowców naturalnych (kukurydzy, melasy sojowej, hydrolizatów drewna). Postęp w badaniach umożliwił uczynienie tej fermentacji procesem korzystnym dla środowiska oraz konkurencyjnym z ekonomicznego punktu widzenia [19, 43, 74]. Na początku XX wieku fermentacja tego typu stosowana była wyłącznie do produkcji etanolu. Jednakże w kolejnych latach była wykorzystywana również do produkcji pozostałych metabolitów (butanolu i acetonu) [63, 74, 84]. Butanol stanowi dodatek do paliwa, który umożliwia znaczną redukcją wydzielanego dymu [54].

W hodowli dolewowej klostridiów produkujących rozpuszczalniki wyróżnia się dwie znaczące fazy wzrostu. Podczas wczesnej fazy wzrostu (faza kwasowa) głównie produkowane są takie metabolity, jak aceton, maślan, wodór i dwutlenek węgla, co powoduje spadek pH pożywki hodowlanej. W kolejnym etapie hodowli następuje zmiana w metabolizmie i wówczas produkowane są butanol, aceton/izopropanol, etanol, a także wodór i dwutlenek węgla (faza produkcji rozpuszczalników). pH pożywki hodowlanej wzrasta podczas produkcji rozpuszczalników w wyniku częściowej reutylizacji produkowanych wcześniej kwasowych produktów końcowych [46]. Badania nad bakteriami należącymi do *Clostridium* spp. pokazały, że w sytuacji niedoboru źródła węgla w pożywce produkowane są tylko kwasy [67]. Minimalnie 10 g/l glukozy musi być obecne podłożu, by bakterie należące do *Cl. saccharobutylicum* mogły produkować rozpuszczalniki [62]. W przypadku *Cl. acetobutylicum* nawet jeżeli w pożywce hodowlanej znajduje się mniej niż 10 g/l glukozy w hodowli dolewowej oraz mniej niż 4 g/l w okresowo-dolewowej, rozpuszczalniki są normalnie produkowane [27, 46].

Oprócz reakcji glikolitycznych, szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników dzieli sekwencję następujących po sobie reakcji między pirogronianem i butyrylo-CoA [46]. Podczas fazy produkcji kwasów, aceton produkowany jest z acetylo-CoA, a maślan z butyrylo-CoA. Produkcja ta odbywa się poprzez dwa analogiczne szlaki, podczas których powstaje jedna cząsteczka ATP na każdą reakcję. Podczas produkcji rozpuszczalników, acetylo-CoA i butyrylo-CoA funkcjonują jako kluczowe czynniki pośrednie do produkcji etanolu i butanolu. Acetylo-CoA stanowi kluczowy czynnik pośredni dla syntezy acetonu. U niektórych szczepów *Cl. beijerinckii* i *Cl. aurantibutyricum* aceton jest w późniejszych etapach redukowany do izopropanolu. Zarówno dehydrogenaza aldehydowa, jak i dehydrogenaza alkoholowa są niezbędne do produkcji alkoholi. Pomiary aktywności dehydrogenazy aldehydowej pokazały, że enzym ten jest zdolny do syntezy dwóch aldehydowych półproduktów – aldehydu butylowego i aldehydu octowego, które są niezbędne do wytwarzania butanolu i etanolu przez *Cl. saccharobutylicum* i *Cl. beijerinckii* [32, 46]. Szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników przez *Clostridium* sp. przedstawiony został na Rys. 1.

Potencjał tanich surowców rolniczych może być wykorzystany tylko wówczas, jeżeli stosowane będą nowoczesne technologie biokonwersji do związków będących pochodnymi paliw. Wydajność produkcji rozpuszczalników w tradycyjnym reaktorze jest niska i wynosi 0,1–0,3 $l^{-1}h^{-1}$. Ponadto wymagane są duże zbiorniki fermentacyjne oraz długie procesy fermentacji. Naukowcy nieustannie poszukują rozwiązań tych problemów. Jednym z nich jest zastosowanie immobilizowanych komórek *Cl. beijerinckii w* procesie fermentacji w celu intensyfikacji produkcji rozpuszczalników [74]. Stosować z powodzeniem można dwie techniki immobilizacji adsorpcję oraz pułapkowanie wewnątrz karagenu i chitozanu [29] oraz alginianu wapnia [54].



Rys. 1 Szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników przez *Clostridium beijerinckii*

Enzymy katalizujące reakcję: 1) oksydoreduktaza pirogronian/ferredoksyna; 2) tiolaza; 3) dehydrogenaza 3-hydroksymaślano-CoA; 4) krotonaza; 5) dehydrogenaza maślano-CoA; 6) fosfotransacetylaza; 7) kinaza octanu; 8) fosfotransbutyrylaza; 9) kinaza maślanu; 10) dehydrogenaza aldehydu; 11) dehydrogenaza alkoholowa; 12) transferaza acetoacetylo-CoA:octan/maślano-CoA; 13) dekarboksylaza acetooctanu; 14) dehydrogenaza alkoholowa; 15) dehydrogenaza aldehydu; 16) dehydrogenaza alkoholowa

3.2. Synteza 1,3-propanodiolu

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem bakterii należących do *Clostridium* spp. w produkcji 1,3-propanodiolu (1,3-PD). Spośród tej grupy mikroorganizmów najczęściej do produkcji tego diolu stosuje się takie szczepy, jak między innymi *Cl. diolis*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. butylicum*, *Cl. perfingens*, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* [8, 57]. Wśród nich bardzo ważną rolę odgrywa *Cl. butyricum* – charakteryzuje się on wysoką produktywnością oraz małymi wymaganiami podczas hodowli [14, 23]. Podczas produkcji 1,3-PD przez *Cl. pasteurianum* produkowane są także inne metabolity, etanol, kwas octowy oraz butanol [10, 47].

1,3-PD zidentyfikowany został w 1881 roku przez Augusta Freunda podczas fermentacji prowadzonej przez *Cl. pasteurianum*. Produktami w takiej fermentacji są także butanol, etanol i kwas octowy [8]. Klostridia fermentujące glicerol do 1,3-PD zostały natomiast opisane dopiero w roku 1983 [9]. 1,3-PD posiada szerokie zastosowanie w przemyśle, między innymi stanowi wartościowy półprodukt w produkcji polimerów (między innymi poliestrów, polieterów oraz poliuretanów), smarów, kosmetyków, związków pierścieniowych, a także w medycynie [9, 68]. Materiały powstałe z reakcji

Tabela I

Wybrane przykłady syntezy 1,3-PD z odpadowego oraz czystego glicerolu przez wybrane szczepy *Clostridium*

Produkt	Produkty uboczne	Substrat	Szczep	Piśmiennictwo
1,3-Propanodiol (48 g/l, Y = 0,66)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	*Clostridium butyricum* F2b	[72, 73]
1,3-Propanodiol (30,5 g/l, Y = 0,61)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	*Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5)	[31]
1,3-Propanodiol (86 g/l, Y = 0,65)	Octan, maślan	Czysty glicerol	*Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5)	[35]
1,3-Propanodiol (66,6 g/l, Y = 0,69)	Maślan	Czysty glicerol	*Clostridium butyricum VPI3266*	[31, 79]
1,3-Propanodiol (63,4 g/l, Y = 0,69)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	*Clostridium butyricum CNCM1211*	[4]
Butanol	1,3-Propanodiol, etanol, maślan, octan	Czysty glicerol	*Clostridium pasteurianum DSM525*	[10]

Y = mol produktu/mol glicerolu

polimeryzacji 1,3-PD charakteryzują się wysokim bezpieczeństwem przemysłowym, wysoką specyficznością, a ponadto stosunkowo niską ceną [51].

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie biotechnologiczną produkcją 1,3-PD z glicerolu będącego produktem ubocznym z produkcji biodiesla. W 2010 roku produkcja biodiesla w Polsce osiągnęła poziom 1,5 mln ton. Równocześnie powstał problem z zagospodarowaniem 300 tys. ton fazy glicerynowej, której zbyt istotnie wpływa na cenę biopaliwa. Zastosowanie odpadowego glicerolu do produkcji przemysłowo użytecznych metabolitów, w tym 1,3-PD, z jednej strony umożliwi utrzymanie cen biopaliwa na niższym poziomie, z drugiej zaś strony da możliwość pozyskiwania ważnych metabolitów z tanich surowców [51]. Wybrane przykłady syntezy 1,3-PD z odpadowego oraz czystego glicerolu przez szczepy *Clostridium* zostały przedstawione w tabeli I.

3.3. Produkcja kwasów

Bakterie z rodzaju *Clostridium* wykazują także zdolność syntezy kwasów, między innymi bursztynowego, octowego, masłowego, propionowy i mlekowego [40, 65, 87]. Kwas masłowy znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym (do syntezy polimerów butyrylowych), farmaceutycznym, a ponadto stosowany jest w technologii spożywczej do wzmacniania masłowej nuty smakowej w produktach spożywczych [61, 89, 91]. Estry kwasu masłowego znajdują także zastosowanie jako składniki aromatyczne w produkcji perfum [89]. Kwas masłowy wytwarzany jest głównie poprzez oksydację aldehydu butyrylu otrzymywanego w wyniku oksosyntezy propylenu [89]. Obecnie jednak, obserwuje się wzrost zainteresowania produkcją tego metabolitu z biomasy poprzez fermentację [91]. Znanych jest wiele rodzajów bakterii beztlenowych produkujących kwas masłowy jako główny produkt fermentacji, między innymi *Butyrvibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* oraz *Megasphera*. Jednakże, w przemyśle zdecydowanie preferowane do tego celu są szczepy należące do *Clostridium* spp. (m.in. *Cl. butyricim*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. populeti*, *Cl. thermobutyricum* i *Cl. tyrobityricum*) [90–91]. Zaletą tych bakterii jest umiejętność fermentowania ksylozy, co czyni je szczególnie przydatnymi w produkcji kwasu masłowego z biomasy [90]. Spośród bakterii należących do *Clostridium* dobrym producentem jest *Cl. tyrobutyricum*. Bakterie te mają małe wymagania pokarmowe, a przy tym wykazują znaczną wydajność syntezy kwasu masłowego o wysokiej czystości. Jednakże, tak jak inne bakterie kwasogenne, bakterie kwasu masłowego podlegają inhibicji zwrotnej [89].

Kwas octowy stosowany jest m.in do produkcji sztucznego jedwabiu, leków, niepalnej taśmy filmowej, kwasu chlorooctowego, octanów, karboksymetylocelulozy, octanu celulozy, jako ocet spożywczy do konserwacji żywności. Nowe przemysłowe zastosowania kwasu octowego obejmują produkcję octanu wapniowo-magnezowego jako niekorozyjnego środka topiącego lód na drogach oraz octan potasu i octan sodu jako środka topiącego lód na pasach startowych na lotniskach. Substancje te są ekologiczne, ale bardzo kosztowne. Dlatego też poszukuje się tanich metod produkcji kwasu octowego oraz octanu poprzez beztlenową fermentację surowców odnawialnych (m.in. glukozy, biomasy drzewnej, odpadów z przemysłu spożywczego). Spośród szczepów *Clostridium* do produkcji kwasu octowego zdolne są m.in. *Cl. thermoaceticum* oraz *Cl. formicoaceticum* (mikroorganizm zdolny do fermentacji fruktozy do kwasu octowego). Kwas octowy jest również często produktem ubocznym podczas otrzymywania innych metabolitów, np. 1,3-PD w wyniku fermentacji glukozy za pomocą *Cl. butyricum* oraz kwasu propionowego w wyniku fermentacji z udziałem *Cl. propionicum* [36, 40, 76, 81].

Kwas propionowy stosowany jest w przemyśle jako konserwant przedłużający zdatność do spożycia produktów spożywczych, działając jako inhibitor pleśni i niektórych bakterii [88]. Metabolit ten otrzymywany jest dla przemysłu spożywczego głównie w wyniku syntezy chemicznej. Powodem tego jest niska wydajność

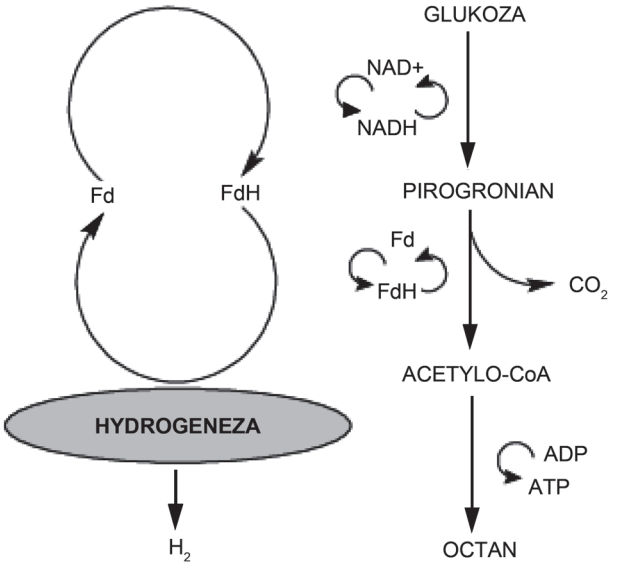
produkcji na drodze fermentacji. Jednakże, opracowanie wydajnej technologii fermentacji propionowej, uczyniłoby technikę tę mocno konkurencyjną dla syntezy chemicznej. Kwas propionowy produkowany jest głównie przez bakterie należące do *Propionibacterium* spp. oraz przez *Cl. propionicum*, mikroorganizm wyizolowany z mułu morskiego. *Cl. propionicum* produkuje kwas propionowy prowadząc rozkład mleczanu, akrylanu i pirogronianu. Podczas tego procesu powstają także kwas octowy oraz dwutlenek węgla [40, 52]. Ponadto, znane są także inne szczepy zdolne do syntezy kwasu propionowego, tj. *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi*, *Cl. botulinum* typ C i D, *Cl. quericolum* oraz *Cl. arcticum* [7].

3.4. Produkcja wodoru

Wodór uważany jest za jeden z istotniejszych nośników energii i określany mianem paliwa XXI wieku. Wodór stanowi czyste źródło energii, gdyż jedynym produktem jego spalania jest woda. Kolejną zaletą wodoru jest fakt, że stanowi on bardzo wydajne źródło energii o energii właściwej równej 33 Whg^{-1}. Pierwiastek też może być przekształcany w energię w silnikach spalinowych oraz w chemicznych ogniwach paliwowych. Wchodzi także w skład paliw rakietowych [82]. Obecnie 90% wodoru jest produkowane z metanu albo w wyniku elekrolizy wody. Zużycie wodoru stanowi zaledwie 3% całkowitego zużycia energii [58].

Wodór wytwarzany jest głównie metodami chemicznymi [17]. Jednakże, w ciągu ostatnich dwudziestu lat prowadzonych było wiele badań dotyczących biologicznych procesów produkcji wodoru. Opisano między innymi pośrednią i bezpośrednią biofotolizę, fotofermentację oraz ciemną fermentację [58]. Obiecującym rozwiązaniem dla biologicznej produkcji wodoru jest fermentacja wodorowa. Przebiega ona zarówno w warunkach mezofilnych, termofilnych oraz ekremotermofilnych. Podczas przemian metabolicznych prowadzących do wytworzenia wodoru z glukozy, glukoza rozkładana jest w szlaku glikolizy do pirogronianu. Powstające elektrony przenoszone są na NAD. Pirogronian zostaje utleniony przez oksydoreduktazę pirogronian:ferredoksyna do acetyl-CoA i dwutlenku węgla. Elektrony przenoszone są na ferredoksynę. Wodór produkowany jest przez hydrogenazę, która katalizuje redukcję protonów wykorzystując elektrony z ferredoksyny. Wytwarzanie wodoru kontrolowane jest termodynamicznie przez stężenie wodoru cząsteczkowego [82, 86].

Spośród wielu mikroorganizmów zdolnych do wy+ twarzania wodoru, najbardziej powszechnie stosowane są beztlenowe kwasogenne bakterie (*Cl. acetobutylicum* oraz *Cl butyricum*), względne beztlenowce (*Enterobacter aerogenes* i *Enterobacter cloacae*) oraz fotosyntetyczne bakterie (*Rhodobacter sphaeroides* i *R. capsulatus*) [16–17].



Rys. 2. Schemat wytwarzania wodoru przez klostridia

Ciekawą grupę mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy wodoru stanowi *Clostridium* spp. Klostridia kwalifikuje się jako proteolityczne albo sacharolityczne w zależności od substratów, które fermentują. Typ proteolityczny zdolny jest do degradacji białek i aminokwasów. Bakterie sacharolityczne fermentują węglowodany i są zdolne do wytwarzania większych ilości wodoru. Przykładem tej grupy jest *Cl. butyricum*. Głównym produktem fermentacji u tych bakterii jest kwas masłowy, a jako produkty uboczne powstają CO_2, octan i wodór. Reakcja fermentacji wodorowej wygląda następująco:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 5\,H_2O \rightarrow 4\,CH_3COOH + 4\,CO_2 + 8\,H_2$$
$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2\,CH_3CH_2CH_2COOH + 4\,CO_2 + 4\,H_2 \quad [49]$$

Identyczny szlak występuje u ponad 50% poznanych bakterii z rodziny *Clostridium*. Istnieją jednak w tej grupie mikroorganizmów także szczepy zdolne do produkcji wodoru nie tylko z glicerolu, ale także z ksylozy (*Cl. tyrobutyricum*), [61] oraz szczepy wytwarzające wodór z substratów celulozowych (*Cl. thermocellum*) [58].

Typowy schemat wytwarzania wodoru przez klostridia przedstawiony został na Rys. 2.

3.5. Inne metabolity

Bakterie z rodzaju *Clostridium* posiadają specyficzne uzdolnienia biochemiczne. Pełnią pożyteczną rolę w przyrodzie biorąc udział w mineralizacji gleby i przetwarzaniu materii organicznej. Ponadto, produkty fermentacji stanowią źródło pokarmu i energii dla wielu mikroorganizmów bytujących w glebie. Bardzo ważną cechą tych bakterii jest zdolność asymilacji azotu atmosferycznego w warunkach beztlenowych. Gatunki proteolityczne tych bakterii poprzez fermentację pektyn rozluźniają strukturę tkankową roślin ułatwiając oddzie-

lenie włókien celulozowych, co czyni je przydatnymi we wstępnym oczyszczaniu lnu i konopi [69].

W literaturze pojawiły się doniesienia o wykorzystaniu bakterii należących do *Clostridium* spp. w celu produkcji bakteriocyn. Taką zdolność posiada *Cl. botulinum*. Mikroorganizm ten jest silnym patogenem, wytwarzającym niebezpieczne toksyny. Okazało się jednak że jest on także zdolny do wytwarzania bakteriocyn [26].

4. Wykorzystanie bakterii z rodzaju *Clostridium* w medycynie i kosmetyce

Oczyszczona neurotoksyna typu A-G (NTX) produkowana przez *Cl. botulinum* stosowana jest w trudności leczenia trzymania moczu wynikających z przewlekłej nadmiernej aktywności mięśnia wypierającego pęcherz. Masa molekularna neurotoksyny A-G wynosi 150 kDa. W hodowlach płynnych oraz w żywności o kwasowym pH neurotoksyny te złączone są z czynnikiem nietoksycznym i tworzą duży kompleks zwany prekursorem toksyn (PTX). Typy A i B PTX są stosowane także w leczeniu zeza, kurczów powiek, oczopląsu, skurczu mięśni twarzy, bezgłosu skurczowego i wielu innych dystonii w tym także szyjnych. Taka terapia jest bardzo skuteczna, jednakże występuje poważny problem związany z wytwarzaniem przeciwciał anty-PTX zawierających anty-NTX przez niektórych pacjentów po przebytej chorobie [38, 55–56, 59]. Pojawiają się także doniesienia dotyczące zastosowania toksyn botulinowych w leczeniu syndromu suchego oka oraz tzw. syndromu krokodylich łez. W pierwszym przypadku toksyny te powodują porażenie mięśnia pierścieniowatego oka, co uniemożliwia wypływanie łez z oka na policzek (łzy pozostają w worku spojówkowym) [21, 33, 83]. Syndrom krokodylich łez powodowany jest przez nadmierną regenerację gruczołu nerwu łzowego. Terapia polega na wstrzykiwaniu w to wyznaczone miejsce preparatu toksyny botulinowej. W obu przypadkach terapia przynosi bardzo dobre rezultaty [83].

W celach terapeutycznych wykorzystywane są nie tylko metabolity bakterii należących do *Clostridium* spp., ale także całe komórki bakteryjne. W badaniach klinicznych wykazano, że mogą być one wykorzystywane jako czynniki probiotyczne przeciwko krwotokom wewnętrznym powodowanym przez enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli*. Ponadto, inhibitują one wzrost *Cl. difficle*, *Salmonella typhimurium* i *Vibrio* spp. [71, 75].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o wykorzystaniu rekombinowanych przetrwalników *Clostridium* spp. w terapii nowotworów. Niepatogenne klostridia takie, jak *Cl. acetobutylicum* stosowane są jako specyficzne wektory do wybiórczego wybarwiania terapeutycznych białek dla litych guzów [71, 78]. Ich specyficzność dla komórek litych guzów oparta jest na martwiczej, pozbawionej tlenu naturze takich guzów. Rekombinowane przetrwalniki, niosące informację genetyczną dla rekombinowanych białek wstrzykiwane są do chorego organizmu. Zdrowe jego tkanki są dobrze natlenione i uniemożliwiają kiełkowanie i wzrost ściśle beztlenowych bakterii. Jednakże sąsiedztwo komórek nowotworowych, które pozbawione są tlenu, umożliwia kiełkowanie spor i proliferację przez komórki wegetatywne kosztem jedynie komórek martwiczych. W ten sposób dochodzi do ekspresji białek terapeutycznych, które niszczą komórki nowotworowe. Obecnie badane są dwie różne ścieżki: enzymy przekształcające nieszkodliwe proleki w leki wysoce toksyczne [28, 71, 73] oraz cytokiny takie jak czynniki martwicze guza [64, 71].

W medycynie stosowane są także liczne enzymy produkowane przez *Clostridium*, między innymi amylazy, celulazy, pektynazy, pullulanazy i proteinazy. Enzymem szczególnie ważnym dla celów medycznych jest produkowana przez *Cl. histolyticum* kolagenaza. Kolagen stanowi 75% suchej masy tkanki skórnej, dlatego też daje bardzo dobre efekty w leczeniu ubytków skórnych powstałych między innymi wskutek poparzeń [71].

Klostridia znajdują zastosowanie także w kosmetyce [50] oraz w medycynie estetycznej. Po raz pierwszy toksyny botulinowe do leczenia zmarszczek mimicznych zostały zastosowane w roku 1980. Terapia taka jest bardziej skuteczna od innych, a ponadto uniemożliwia powstawanie nowych zmarszczek. Wyraźną poprawę napięcia skóry twarzy obserwuje się u około 90% pacjentów. Pierwszy efekt przy takiej terapii obserwowany jest już po 1–4 dniach, a maksymalny po 2–3 tygodniach. Efekt ostateczny otrzymuje się natomiast po 3–6 miesiącach terapii. Zmarszczki mimiczne powstają przede wszystkim w wyniku intensywnej pracy mięśnia czołowego, mięśni marszczących brwi oraz mięśnia podłużnego. Terapia polega na wstrzykiwaniu do tych mięśni różnych dawek toksyny botulinowej. Preparaty toksyny botulinowej stosowane są także w innych celach w kosmetyce i medycynie estetycznej, między innymi wstrzykiwane są w miejsca ran w celu uniemożliwienia powstawania blizny oraz przyspieszenia regeneracji uszkodzonej skóry. Preparaty te stosowane są także do usuwania zbędnego owłosienia oraz do chemicznej liposukcji [1, 5–6, 20–21, 37, 45, 50, 60].

5. Podsumowanie

Rodzaj *Clostridium* obejmuje wiele gatunków, które wykazują szeroki zakres cech biochemicznych i fizjologicznych, które z jednej strony odpowiadają za patogenność tej grupy, a z drugiej umożliwiają ich przemysłowe wykorzystanie. Klostridia mogą być one stosowane między innymi do produkcji kwasów i rozpuszczalników. Nawet szczepy patogenne (m.in. *Cl. botulinum*), są coraz

częściej wykorzystywane w medycynie, w terapiach nowotworów, a także w kosmetologii w celu usuwania zmarszczek. Te pozytywne aspekty bakterii z rodzaju *Clostridium* powodują, że nieustannie wzrasta zainteresowanie stosowaniem ich w różnych gałęziach przemysłu. Należy uzmysłowić społeczeństwu, że bakterie te nie są jedynie producentami toksyn ani wrogiem ludzkości, ale mają wiele pozytywnych cech, których umiejętność wykorzystania może w przyszłości przynieść wiele korzyści, a także ratować życie ludzkie.

6. Piśmiennictwo

1. Adelson R.: Botulinum neurotoxins: Fundamentals for the facial plastic surgeon. *Am. J. Otolaryngol*. **28**, 260–266 (2007)
2. Bahl H., Gottschalk G. (w) Biotechnology, red. H.J. Rehm i G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 56–72 (1998)
3. Barber J.M., Robb F.T., Webster J.R., Woods D.R.: Bacteriocin Production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation process. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 433–437 (1979)
4. Barbirato F., Himmi E.H., Conte T., Bories A.: 1,3-Propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Products*, **7**, 281–289 (1998)
5. Bassichis B.A.: Cosmetic use of botulinum toxin in the upper face. *Oper. Tech. Otolaryngol*. **18**, 248–253 (2007)
6. Berny-Moreno J., Brancewicz-Łosek M.: Toksyna botulinowa – fenomen trucizny. *Pol. Merk Lek*. **20**, 482–485 (2006)
7. Krieg N.R.: (Reds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, USA, 102–132 (2011)
8. Biebl H., Zeng A.P., Menzel K., Deckwer W.D.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumonia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24–29 (1998)
9. Biebl H., Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D.: Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **52**, 289–297 (1999)
10. Biebl H.: Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **27**, 18–26 (2001)
11. Bielec D., Modrzewska R.: Zatrucie jadem kiełbasianym dawniej i dziś – aspekty kliniczne. *Przegl. Epidemiol*. **61**, 505–512 (2007)
12. Bigalke H., Shoer L.F. (w) Bacterial Protein Toxins. Handbook of Experimental Pharmacology, red. Aktories K., Just I., Springer-Verlag, Berlin, 407–443 (2000)
13. Brin M.F.: Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle & Nerve* **20**, 156–168 (1997)
14. Buckel W. (w) Handbook on Clostridia, CRC Press LLC, Boca Raton, 81–85 (2005)
15. Chen J.S., Hiu S.F.: Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym *Clostridium butylicum*). *Biotech. Lett*. **8**, 371–376 (1986)
16. Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S., Hang J.S.: Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Eng.* **30**, 1063–1070 (2005)
17. Chin H.L., Chen Z.S., Chou C.P.: Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* **19**, 383–388 (2003)
18. Clarke D.J., Moyra R. R., Morris J.G.: Purification of two *Clostridium bacteriocins* by procedures appropriate to hydrophobic proteins. *AAC*, **3**, 256–264 (1975)
19. Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G.: Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1233–1239 (1992)
20. De Maio M.: Toksyna botulinowa w połączeniu z innymi metodami odmładzającymi. *J. Cosmet. Laser Ther*. **5**, 210–212 (2003)
21. Domżał T.M. Toksyna botulinowa w praktyce lekarskiej. Wyd. Czelej, Lublin, 114–118 (2002)
22. Dressler D. Botulinum toxin therapy, Theme-Verlag, Stuttgard, 64–67 (2000)
23. Drożdżyńska A., Leja K., Czaczyk K.: Biotechnological Production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *J. Biotechnol., Comput. Biol. Bionanotechnol*. **1**, 92–100 (2011)
24. Dürre P.: New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **49**, 639–648 (1988)
25. Dürre P. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 1–6 (2001)
26. Eklund F.T., Poysky L.M., Mseitif T., Strom M.T.: Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. *Appl. Environ. Microbiol*. **54**, 1405–1408 (1988)
27. Fond O., Petitdemange, E., Petitdemange, H., Gay R.: Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnol. Lett*. **6**, 13–18 (1984)
28. Fox J.L.: Harnessing *Salmonella's* positive powers against tumors. *ASM News*, **66**, 332–334 (2000)
29. Frick C., Schugerl K.: Continuous acetone-butanol production with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **25**, 186–193 (1986)
30. George H.A., Johnson J.L., Moore W.E.C., Holdeman L.V., Chen J.S.: Acetone, isopropanol and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *C. butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol*. **45**, 1160–1163 (1983)
31. Gonzàlez-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Soucaille P., Vasconcelos I.: Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl. Environ. Microbiol*. **4**, 96–101 (2006)
32. Harris L.M., Desai R.P., Welker N.E., Papoutsakis E.T.: Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesisand butanol inhibition? *Biotech. Bioeng*. **67**, 1–11 (1999)
33. Hawrot-Kawecka A.: Postępowanie w przypadku ataku bioterrorystycznego, *Świat Med. Farm*. **3**, 52–54 (2003)
34. Heyndrickx M., De Vos P., Vancanneyt M., De Ley J.: The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t_2 and 1213 t_1, and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **34**, 637–642 (1991)
35. Homann T., Tag C., Biebl H., Deckwer W.D., Schink B.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 121–126 (1990)
36. Huang Y.L., Mann K., Novak J.M., Yu S.T.: Acetic Acid Production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog*. **14**, 800–806 (1998)
37. Huang W., Foster J.A., Rogachefsky S.: Pharmacology of botulinum toxin. *J. Am. Acad. Dermatol*. **43**, 249–259 (2000)
38. Jankovic J., Brin M.F.: Therapeutic uses of botulinum toxin. *N. Engl. J. Med*. **324**, 1186–1194 (1991)

39. Jankovic J., Hallet M.: Therapy with botulinum toxin, Marcel Dekker, Inc, New York, 43–45 (1994)
40. Johns A.T.: The Mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. *J . Gen. Microbiol*. **6**, 123–127 (1952)
41. Johnson J.L., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J.S.: Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylcium*, *Clostridium beijerinckii* and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **47**, 420–424 (1997)
42. Johnson E.A., Bradshaw M.: *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*, **39**, 1703–1722 (2001)
43. Jones D.T., van der Westhuizen A., Long S., Allcock E.R, Reid S.J., Woods D.R.: Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. **43**, 1434–1439 (1982)
44. Jones D.T., Woods D.R.: Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 481–524 (1986)
45. Kampioni M.: Wykorzystanie toksyny botulinowej w leczeniu skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych dna macicy. *Nowiny Lek.* **70**, 229–235 (2001)
46. Kasap M.: Nitrogen metabolism and solvent production in *Clostridium beijerinckii* NRRL B593. Ph.D. dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA (2002)
47. Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkác J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P.A.: A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring. *Anal. Bioanal. Chem*. **388**, 287–295 (2007)
48. Keis S., Shahneen R., Jones D.: Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **51**, 2095–2103 (2001)
49. Khanal S.M., Chen W.H., Sung S.: Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1123–1131 (2004)
50. Kizerwetter-Świda M., Binek M.: Zatrucie jadem kiełbasianym – problem wciąż aktualnych. *Post. Mikrobiol*. **40**, 75–85 (2010)
51. Kośmider A., Czaczyk K. Możliwości wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.* **48**, 277–287 (2009)
52. Kośmider A., Drożdżyńska A., Blaszka K., Leja K., Czaczyk K.: Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using industrial wastes: crude glycerol and whey lactose. *Polish J. Environ. Stud.* **19**, 1249–1253 (2010)
53. Kreydon O.P., Geiges M.L., Boni R., Burg G.: Botulinum toxin: from poison to medicine. A historical review. *Hautarzt*, **51**, 733–737 (2000)
54. Largier S.T., Long S., Santangelo J.D., Jones D.T., Woods D.R.: Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P262 mutants for solvent production. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 477–481 (1985)
55. Lee J.C., Yokota K., Arimitsu H., Hwang H.J., Sakaguchi Y., Cui J., Takeshi K., Watanabe T., Ohyama T., Oguma K.: Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of *Clostridium botulinum* type B 16S toxin- hemagglutinin. *Microbiol.* **15**1, 3739–3747 (2005)
56. Lee J.C., Yokoyama T., Hwang H.J., Arimitsu H., Yamamoto Y., Kawasaki M., Takigawa T., Takeshi K., Nishikawa A., Kumon H., Oguma K.: Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory destrusor overactivity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **51**, 201–211 (2007)
57. Leja K., Czaczyk K., Myszka K.: 1,3-Propanediol synthesis by biotechnological way using *Clostridium* ssp. *African J. Biotech*. **10**, 11093–11101 (2011)
58. Levin B.D, Islam R., Cicek N., Sparling R.: Hydrogen production by *Clostridium thermocellu* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1496–1503 (2006)
59. Lew M.F., Brashear A., Factor S.: The safety and efficacy of botulinum toxin type B in the treatment of patients with cervical dystonia: summary of three controlled clinical trials. *Neurology*, **55**: 29–35 (2000)
60. Lim E., Sett R.: Botulinum toxin, Quo Vadis? *Med. Hypotheses*, **69**, 718–723 (2007)
61. Liu X., Zhu Y., Yang S.T.: Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme Microb. Technol*. **38**, 521–528 (2006)
62. Long S., Jones D. T., Woods D.R.: Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262 (now known as *Clostridium* sp. P262). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 256–261 (1984)
63. Lonz, T.G., Moreira A.R.: Economic evaluation of the aceto ne-butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev*. **19**, 478–483 (1980)
64. Low K.B., Ittensohn M. i wsp.: Lipid: A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor--targeting in vivo. *Nature Biotechnol*. **17**, 37–41 (1999)
65. Luers F., Seyfried M., Daniel R., Gottschalk G.: Glycerol conversion by glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 337–345 (1997)
66. Mayr E.: Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York, 34–37(1969)
67. McDaniel L.E., Wooley D.W., Peterson W.H.: Growth factors for bacteria: Nutrient requirements of certain butyl-alcohol producing bacteria. *J. Bacteriol*. **37**, 259–268, 1993
68. Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D.: High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb. Technol*. **20**, 82–86 (1997)
69. Mitchell W.J. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl H., Dürre P. ,Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 60–65 (2001)
70. Moriishi K., Koura M., Abe N., Fujii N., Fujinaga Y., Inoue K., Ogumad K.: Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* strain NCTC 2916. *FEMS Microbiol. Lett*. **140**, 151–158 (1996)
71. Nigel P., Minton J., Brown M., Lambin P., Anne J. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 251–265 (2001)
72. Papanikolaou S., Fick M., Aggelis G.: The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium* butyricum. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. **79**, 1189–1196 (2004)
73. Pawelek J.M., Low K.B., Bermudes D.: Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* **57**, 4537–4544 (1997)
74. Qureshi N., Schripsema J., Lienhardt J., Blaschek H.P.: Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1**6, 377–382 (2000)
75. Ranade V.V.: Drug delivery systems 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J. Cancer Pharmacol*. **29**, 685–694 (1989)
76. Rehman A., MatsumurA M., Nomura N., Sato S.: Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio--diesel raw glycerol using a strictle anaerobe *Clostridium butyricum*. *Curr. Res. Bacteriol*. **1**, 7–16 (2008)

77. Rosetto O., Seveso M., Caccin P., Schiavo G., Montecucco C.: Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon*, ***39***, 27–41 (2001)
78. Rutman R.J., Ritter C.A., Avadhani N.G., Hansel J.: Liposomal potentation of the antitumor activity of alkylating drugs. *Cancer Ther. Rep*. **60**, 617–618 (1976)
79. Saint-Amans S., Perlot P., Goma G., Soucaille P.: High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotech. Lett.* **16**, 831–836 (1994)
80. Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev*. **80**, 717–766 (2000)
81. Schwartz R.D., Keller F.A.: Isolation of a strain of *Clostridium thermoaceticum* capable of growth and acetic acid production at pH 4,5. *Appl. Environ. Microbiol*. **4**3, 117–123 (1982)
82. Sikora A.: Produkcja wodoru w procesach prowadzonych przez drobnoustroje. *Post. Mikrobiol*. **47**, 465–467 (2008)
83. Śliwińska-Mossoń M., Milnerowicz H., Małolepsza K.: Botulinum toxin in conventional and aesthetic medicine. *Adv. Clin. Exp. Med*. **19**, 271–278 (2010)
84. Spivey M. J.: The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Process Biochem*. **13**, 2–5 (1978)
85. Stackebrandt E., Hippe H., Dürre P. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 20–22 (2001)
86. Szewczyk K.W.: Biologiczne wytwarzanie wodoru. *Post. Mikrobiol*. **47**, 243–245 (2008)
87. Willims, E.A., Coxhead, J.M., Mathers, J.C.: Anti-cancer effects of butyrate: use of microarray technology to investigate mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 107–115 (2003)
88. Woskow S.A., Glatz B.: Propionic acid productionacid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinous fermentation. *Appl. Environ. Microb*. **57**, 2821–2828 (1991)
89. Wu Z., Yang S.H.: Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biot. Bioengin*. **82**, 93–102 (2003)
90. Zhu Y., Wu Z., Yang S.T.: Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor. *Proc. Biochem*. **38**, 657–666 (2002)
91. Zigova J., Sturdik E., Dusan V., Schlosser S.: Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Process Biochem.* **34**, 835–843 (1999)
92. Zyska B. (w) Mikrobiologia Techniczna, red. Libudzisz Z., Kowal K., Wyd. Politechniki Łódzkiej, 155–175 (2001)

Praca została przygotowana w ramach projektu POIG 01.01.02-00-074/09 współfinansowanego przez Unię Europejską (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013).

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 25–34
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNE PRZEMIANY KWASU WANILINOWEGO

Magdalena Kurek[1], Izabela Greń[2]*

[1] Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska
[2] Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wpłynęło w listopadzie 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiologiczny rozkład kwasu wanilinowego. 2.1. Demetylacja kwasu wanilinowego. 2.2. Dekarboksylacja kwasu wanilinowego. 2.3. Redukcja kwasu wanilinowego. 3. Synteza kwasu wanilinowego. 3.1. Synteza kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego. 3.2. Synteza kwasu wanilinowego z eugenolu i izoeugenolu. 4. Podsumowanie

Microbial transformation of vanillic acid

Abstract: Increasing demand for natural vanillic aroma in food industry as well as law restrictions for the usage of chemically synthesized compounds in natural fragrances caused large interest in vanillic production via biotechnological processes. Because vanillic acid is the main substrate for vanillic production, the knowledge of biological processes of its synthesis and the release from lignin is crucial for developing the optimal biotechnological processes. Some microorganisms are able to synthesize vanillic acid form naturally occurring compounds, such as ferulic acid, eugenol and isoeugenol using biotransformation reactions. Large amount of vanillin are produced by reduction of vanillic acid by carboxylic acid reductase (Car). Another pathways of vanillic acid transformation are based on its demethylation and decarboxylaction reactions. *O*-demethylases are NAH(P)H or tetrahydrofolic dependent enzymes. This review presents short characterization of vanillic acid transformation processes by microorganisms.

1. Introduction. 2. Microbial degradation of vanillic acid. 2.1. Demetylation of vanillic acid. 2.2. Decarboxylation of vanillic acid. 2.3. Reduction of vanillic acid. 3. Synthesis of vanillic acid. 3.1. Synthesis of vanillic acid from ferulic acid. 3.2. Synthesis of vanillic acid from eugenol and isoeugenol. 4. Summary

Słowa kluczowe: kwas ferulowy, kwas wanilinowy, lignina, transformacja, wanilina
Key words: ferulic acid, lignin,transformation, vanillic acid, vanillin

1. Wprowadzenie

Nieustający wzrost zanieczyszczenia środowiska oraz poprawa świadomości ekologicznej społeczeństwa sprawiają, że prowadzone są liczne badania dotyczące zarówno biologicznego rozkładu ksenobiotyków, jak i biosyntezy, jako bezpiecznej i naturalnej metody produkcji związków, wykorzystywanych w różnych gałęziach przemysłu. Kwas wanilinowy jest surowcem odnawialnym i obok kwasu ferulowego stanowi główny produkt niecałkowitego, mikrobiologicznego rozkładu ligniny. Jednocześnie jest metabolitem pośrednim katabolizmu i anabolizmu waniliny, powszechnie stosowanego dodatku do żywności. Praca jest przeglądem piśmiennictwa, dotyczącego udziału mikroorganizmów w różnych przemianach kwasu wanilinowego.

Kwas wanilinowy, czyli kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy, należy do grupy związków aromatycznych, spotykanych naturalnie u roślin. Występuje w dużych ilościach w nasionach pnączy wanilii *Vanilla planifolia*, jak również w wielu innych warzywach i owocach, takich jak: winogrona, pomidory, czarne porzeczki, borówki, ziarna pszenicy i soi [11, 20]. Obecność kwasu wanilinowego stwierdzono również w liściach wielu roślin m.in. *Adenostoma* i *Arctostaphylos*, charakterystycznych dla makii kalifornijskiej, u których pełni on funkcję inhibitora kiełkowania nasion traw i innych roślin zielonych. Obecność kwasu wanilinowego wykazano również w glebie w miejscu występowania tych roślin, co świadczy o niskim stopniu transformacji tego związku przez mikroorganizmy glebowe [14].

Kwas wanilinowy wykazuje właściwości przeciwutleniające i antymutagenne. Aktywność antyoksydacyjna kwasu wanilinowego wynika z obecności pierścienia fenolowego, podstawionego w pozycji *para* i jest dodatkowo wzmocniona obecnością grupy metoksy w pozycji *orto* w stosunku do podstawnika hydroksylowego. Wykazano, że na aktywność przeciwutleniającą kwasu wanilinowego, podobnie jak innych pochodnych kwasu benzoesowego i cynamonowego, wpływa estryfikacja, a właściwości redukcyjne są wyższe dla formy wolnej niż metylowanego estru [33, 34]. Ze względu na obecność grupy metoksy (alkoksylowej) w pozycji *meta* pierścienia aromatycznego kwas wanilinowy jest silniejszy niż kwas benzoesowy, co można tłumaczyć efektem indukcyjnym, powodującym wyciąganie elektronów ze względu na elektroujemność atomu tlenu, bezpośrednio połączonego z pierścieniem aromatycznym (Rys. 1) [21].

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; e-mail: izabela.gren@us.edu.pl

2. Mikrobiologiczny rozkład kwasu wanilinowego

Lignina jest aromatyczną substancją wielkocząsteczkową, zapewniającą wytrzymałość roślinnych ścian komórkowych i stanowi istotną część trudno biodegradowalnych odpadów przemysłu papierniczego, spożywczego czy obróbki drewna. Prowadzone są liczne badania nad poznaniem poszczególnych etapów biotransformacji ligniny oraz powstających w wyniku niecałkowitego rozkładu tego związku metabolitów pośrednich, takich jak kwas ferulowy i wanilinowy, a także możliwościami ich wykorzystywania w procesach biosyntezy. Tlenowa biodegradacja ligniny jest procesem wieloetapowym, w którym uczestniczą liczne gatunki grzybów, przeprowadzających depolimeryzację oraz bakterii, katalizujących rozkład poszczególnych składników aromatycznych [19, 25, 30]. Aby kontrolować biodegradację ligniny oraz zwiększyć wydajność poszczególnych etapów procesu, konieczne jest dokładne poznanie właściwości biochemicznych przeprowadzających je mikroorganizmów oraz izolacja i charakterystyka enzymów, katalizujących kluczowe reakcje.

Rozkład kwasu wanilinowego, jednego z istotnych związków aromatycznych uwalnianych w wyniku częściowej biotransformacji ligniny, może przebiegać kilkoma różnymi szlakami (rys. 1). Najbardziej rozpowszechnione u bakterii to demetylacja do kwasu protokatechowego, katalizowana przez demetylazę kwasu wanilinowego oraz nieoksydacyjna dekarboksylacja do gwajakolu, którą przeprowadza dekarboksylaza kwasu wanilinowego. Związki te są następnie metabolizowane poprzez rozszczepienie pierścienia aromatycznego [25, 30]. Inną przemianą, o dużym znaczeniu przemysłowym, jest redukcja kwasu wanilinowego do waniliny [38].

2.1. Demetylacja kwasu wanilinowego

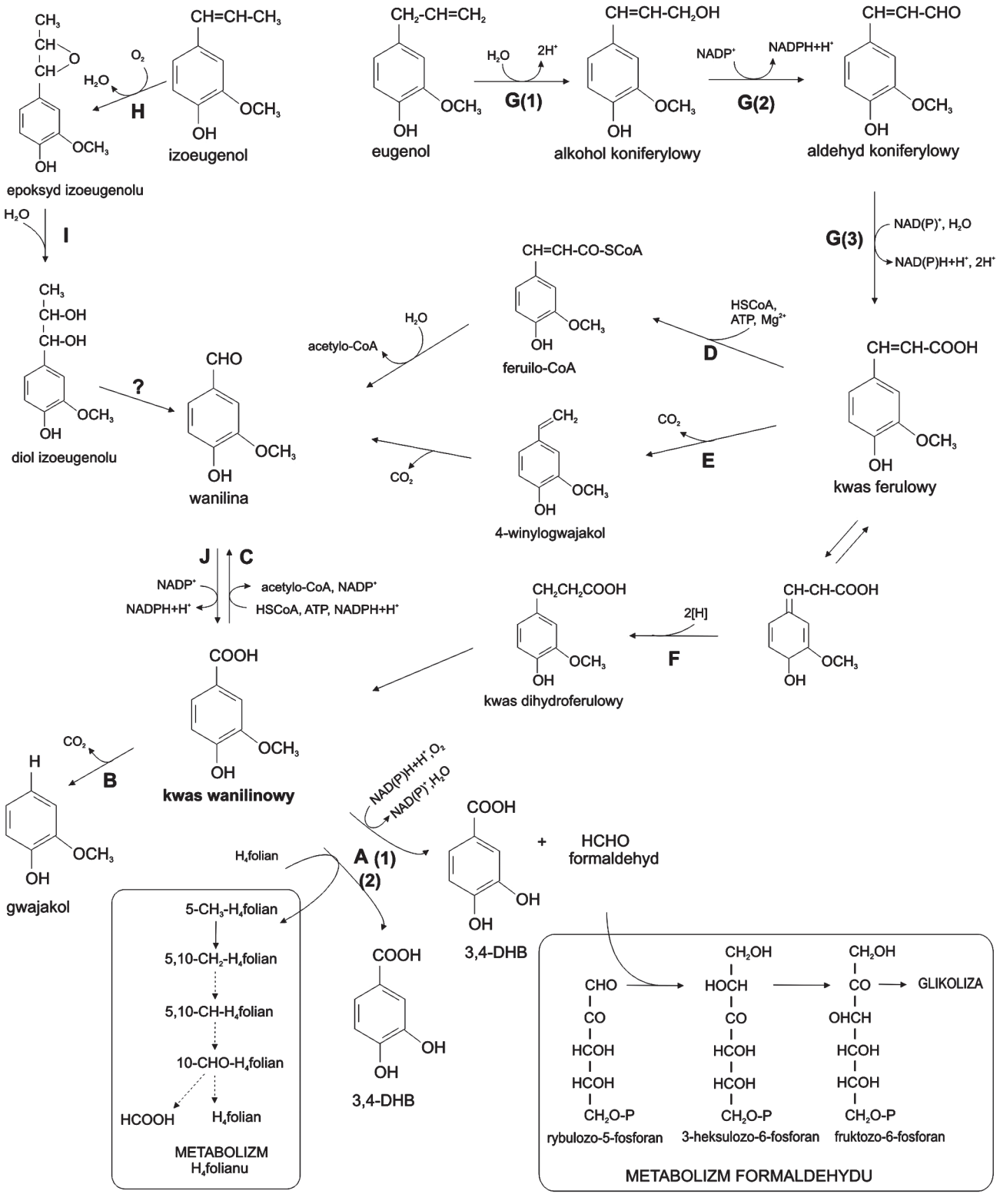
U bakterii zidentyfikowano dwa różne szlaki, którymi może przebiegać demetylacja kwasu wanilinowego do kwasu protokatechowego (rys. 1.A(1) i A(2)). U *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp. metabolizm kwasu wanilinowego rozpoczyna *O*-demetylaza, zależna od NAD(P) H, należąca do oksygenaz. U innych bakterii, m.in. *Sphingomonas paucimobilis*, kwas wanilinowy również ulega *O*-demetylacji do kwasu (3,4-dihydroksybenzoesowego) 3,4-DHB, ale jest to reakcja nieoksydacyjna, w której kofaktorem jest tetrahydrofolian (H_4folian) [1, 30].

Pierwszym etapem biokonwersji kwasu wanilinowego do 3,4-DHB, katalizowanej przez *O*-demetylazę kwasu wanilinowego, zależną od NAD(P)H, jest hydroksylacja. W reakcji tej oksygenaza przyłącza jeden atom tlenu do węgla grupy metylowej, prowadząc do powstania niestabilnego hemiacetalu, a drugi atom tlenu jest włączany do cząsteczki wody. Hemiacetal ulega następnie przekształceniu do 3,4-DHB i formaldehydu [28] (rys. 1A(1)).

O-demetylazy kwasu wanilinowego u *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp., charakteryzują się znaczną homologią sekwencji, i są zbudowane z dwóch podjednostek: oksygenazy (VanA) oraz reduktazy (VanB). Ze względu na dwuczłonową budowę oraz obecność centrów żelazo-siarkowych typu [2Fe-2S], jak i mononukleotydu flawinowego (FMN) należą do klasy IA oksygenaz. W części oksydacyjnej występują natomiast centra żelazo-siarkowe [2Fe-2S] oraz niehemowe żelazo. Elektrony niezbędne w procesie hydroksylacji, przepływają ze zredukowanego nukleotydu (NADH), przez FMN i centrum żelazo siarkowe [2Fe-2S] reduktazy do Fe^{2+}, znajdującego się w oksygenazie. Następuje tu przyłączenie tlenu i hydroksylacja [23, 28]. M o r a w s k i i wsp. [23] wykazali, że demetylaza kwasu wanilinowego, występująca u *Acinetobacter* sp., katalizuje wyłącznie demetylację lub monohydroksylację związków posiadających podstawnik metoksy lub metylowy w pozycji *meta* w stosunku do grupy karboksylowej, gdyż obecność grupy karboksylowej oraz podstawnika w pozycji *meta* jest niezbędna, aby przeprowadzić atak nukleofilowy [23].

U *Comamonas testosteroni* BR6020, metabolizującego kwas wanilinowy, izowanilinowy oraz weratrowy, występują oksygenazy: VanA oraz IvaA. Za demetylację kwasu wanilinowego do 3,4-DHB odpowiada, podobnie jak u *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp., oksygenaza VanA. Transport elektronów z NAD(P)H u tego szczepu, katalizuje oksydoreduktaza IvaB. Enzym ten wykazuje dużą homologię z oksydoreduktazą VanB, występującą u innych bakterii demetylujących kwas wanilinowy[30].

W reakcji demetylacji kwasu wanilinowego powstaje oprócz kwasu protokatechowego również formaldehyd. M i t s u i i wsp. [22], w badaniach prowadzonych nad *Burkholderia cepacia* TM1 wykazali, że enzymy wiążące formaldehyd odgrywają istotną rolę w usuwaniu zanieczyszczeń, w tym transformacji kwasu wanilinowego. Biorąc pod uwagę szlak biokonwersji kwasu wanilinowego do 3,4-DHB, obecny u *Pseudomonas* sp., stwierdzili, że formaldehyd pochodzący z substratu wzrostowego indukuje enzymy: syntazę 3-heksulozo-6-fosforanową (HPS) oraz 6-fosfo-3-heksulozoizomerazę (PHI), zaangażowane w szlak rybulozo-monofosforanowy (RuMP), odpowiedzialny za wiązanie i detoksykację formaldehydu. Zaobserwowali również, że reakcja transformacji formaldehydu jest etapem limitującym szybkość demetylacji kwasu wanilinowego w szlaku zależnym od NAD(P)H, szczególnie przy jego wysokim stężeniu. Fruktozo-6-fosforan, powstały w szlaku RuMP, jest włączany do glikolizy, napędzając metabolizm bakterii [22]. Metabolizm formaldehydu, powiązany z demetylacją kwasu wanilinowego, przedstawiono na rysunku 1A(1).



Rys. 1. Ogólny schemat biosyntezy i transformacji kwasu wanilinowego.

Enzymy katalizujące poszczególne reakcje: **A** *O*-demetylaza kwasu wanilinowego **(1)** zależna od NAD(P)H, **(2)** zależna od tetrahydrofolianu; **B** dekarboksylaza kwasu wanilinowego; **C** reduktaza kwasu wanilinowego; **D** ligaza kwas ferulowy-CoA; **E** dekarboksylaza kwasu ferulowego; **F** reduktaza; **G(1)** oksydaza eugenolowa/oksydaza alkoholu wanilinowego, **G(2)** dehydrogenaza alkoholu koniferylowego, **G(3)** dehydrogenaza aldehydu koniferylowego; **H** monooksygenaza izoeugenolu; **I** hydrolaza; **J** dehydrogenaza wanilinowa.

Drugim systemem enzymatycznym, transformującym kwas wanilinowy do 3,4-DHB, jest aromatyczna *O*-demetylaza, zależna od tetrahydrofolianu (H_4folian) (rys. 1A(2)). Obecność tego enzymu stwierdzono u bakterii anaerobowych, m.in. *Acetobacterium dehalogenans* oraz *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. W tym szlaku

transferaza metylowa I katalizuje transfer grupy metylowej kwasu wanilinowego do białka korynoidowego, a transferaza metylowa II przeprowadza dalszą reakcję przeniesienia grupy metylowej na H_4folian [1, 19]. Aby uzyskać pewność, że demetylaza kwasu wanilinowego u *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 jest zależna od H_4folianu, przeprowadzono doświadczenie, w którym bakterie hodowano w pożywce nie zawierającej tego kofaktora. W takich warunkach hodowli nie następowała demetylacja kwasu wanilinowego do 3,4-DHB [1, 19].

A b e i wsp. [1] zidentyfikowali gen kodujący *O*-demetylazę kwasu wanilinowego, zależną od H_4folianu, w otwartej ramce odczytu *ligM*. Zidentyfikowali również inne geny, kodujące enzymy zaangażowane w demetylację kwasu wanilinowego, a katalizujące metabolizm tetrahydrofolianu: reduktazę 5,10-metyleno-H_4folianową (*metF*) oraz syntetazę 10-formylo- H_4folianową (*ligH*). Geny *metF* i *ligH* są położone poniżej *ligM* i wszystkie razem są transkrybowane wspólnie jako jeden operon [1]. Metabolizm tetrahydrofolianu przedstawiono na rysunku 1A(2).

2.2. Dekarboksylacja kwasu wanilinowego

Drugą, obok demetylacji, ważną przemianą kwasu wanilinowego jest jego nieoksydacyjna dekarboksylacja do gwajakolu, katalizowana przez dekarboksylazę kwasu wanilinowego (rys. 1B). Reakcja ta, opisana m.in. u szczepów *Nocardia* sp. NRRL 5646 oraz *Escherichia coli* C2, nie wymaga obecności żadnych kofaktorów i może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [6, 7, 9]. Proces dekarboksylacji, przebiegający w warunkach tlenowych, u *E. coli* C2 jest jednak bardziej wydajny niż przeprowadzany w warunkach beztlenowych. C h a m k h a i wsp. [6] wykazali, że w obecności tlenu połowa kwasu wanilinowego, znajdującego się w pożywce, ulegała dekarboksylacji w ciągu 9 godzin, natomiast w warunkach anaerobowych proces ten trwał 35 godzin.

Nieoksydacyjna dekarboksylacja kwasu wanilinowego polega na odłączeniu grupy karboksylowej od struktury pierścienia aromatycznego, bez udziału cząsteczki tlenu. D h a r i wsp. [9], w badaniach przeprowadzonych z udziałem *Nocardia* sp. NRRL 5646, wykazali, że reakcja dekarboksylacji kwasu wanilinowego do gwajakolu przebiega z wytworzeniem chinoidynowego metabolitu pośredniego [9]. Enzym katalizujący tą przemianę wykazuje wąską specyficzność substratową, a transformacji podlegają wyłącznie kwasy benzoesowe, podstawione grupą hydroksylową w pozycji *para* w stosunku do grupy karboksylowej. Dodatkowo wymagany jest brak podstawnika w pozycji *meta* lub obecność grupy metoksy [6, 9].

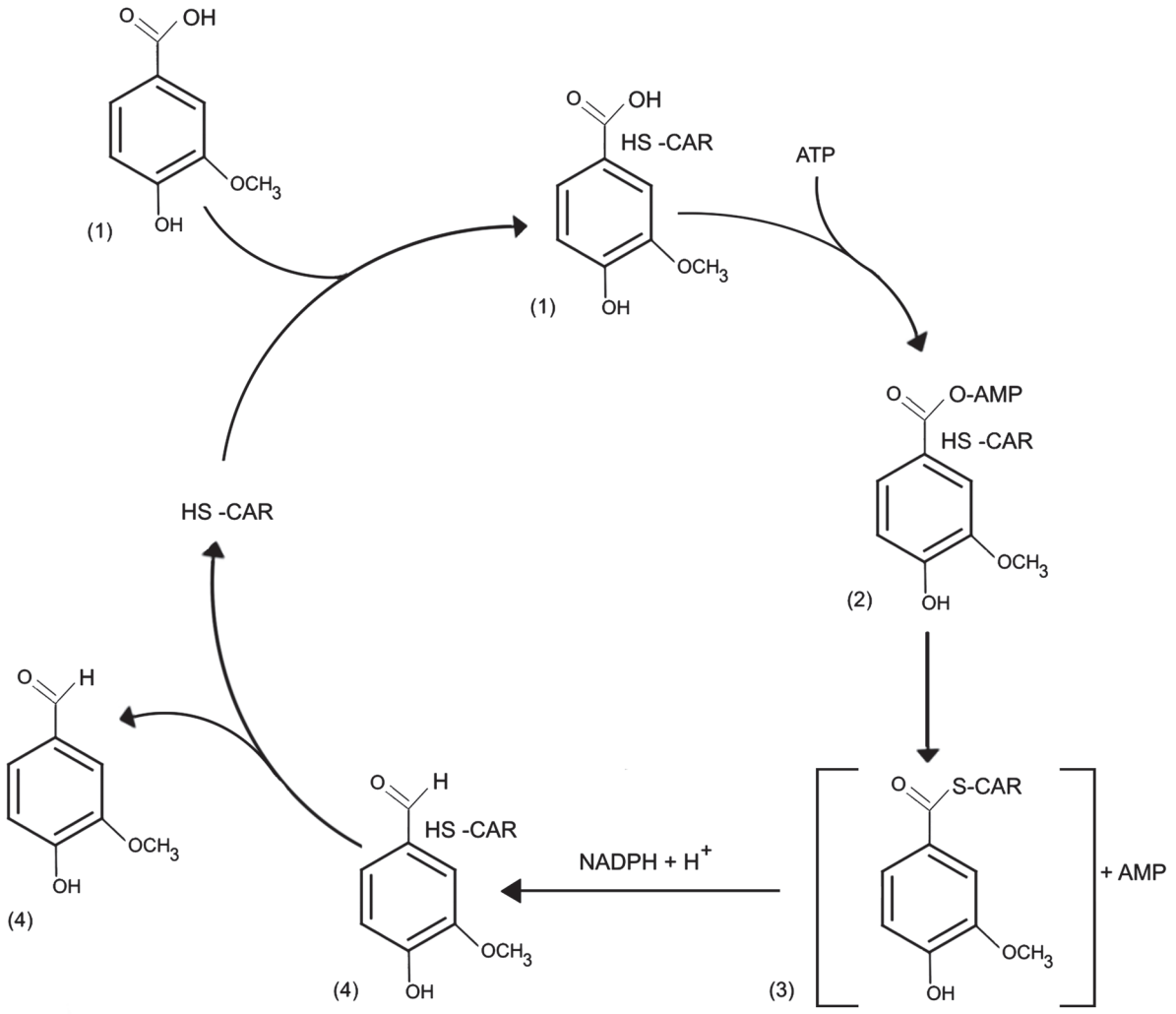
Obecność gwajakolu stwierdzono w wielu winach. Wyizolowano więc mikroorganizmy znajdujące się w korku, którym były zamykane. Wykazano, że występuje tam wiele gatunków drożdży, grzybów nitkowatych i pleśniowych oraz bakterii. Przeprowadzono testy na wszystkich mikroorganizmach i zaobserwowano, że cztery szczepy: *Streptomyces* sp. A3, *Streptomyces* sp. A5, *Streptomyces* sp. A13 i *Bacillus subtilis*, były zdolne do dekarboksylacji kwasu wanilinowego. Największą wydajność biotransformacji wykazywał szczep *B. subtilis*, który po 33 h transformował około 55,4% kwasu wanilinowego do gwajakolu, który nie podlegał dalszym przemianom. Dla szczepów z rodzaju *Streptomyces*, A3, A5 i A13, maksymalny poziom dekarboksylacji wynosił, odpowiednio, 34,4%, 40,4% i 53,3%, a ilość zakumulowanego gwajakolu wynosiła 14,3%, 20% i 27,3%. Świadczy to o zdolności tych szczepów do dalszej transformacji gwajakolu w szlaku β-ketoadypinowym [2].

Dekarboksylacja kwasu wanilinowego do gwajakolu jest również charakterystyczna dla grzybów *Rhodotorula rubra* oraz *Sporotrichum termophile* w procesie biotransformacji kwasu ferulowego. U *R. rubra* kwas wanilinowy ulega też jednoczesnej demetylacji do kwasu protokatechowego [2, 15, 35]. Zdolność do przeprowadzania zarówno demetylacji, jak i dekarboksylacji kwasu wanilinowego, wykazuje także *Streptomyces* sp. NL15-2K, jednak u tego mikroorganizmu w danym momencie może funkcjonować tylko jeden szlak przemian. Główną drogą transformacji kwasu wanilinowego u NL15-2K jest demetylacja, a szlak dekarboksylacyjny jest w tym momencie wyłączany. Aktywacja tego szlaku zachodzi wyłącznie w obecności kwasu protokatechowego lub weratrowego i funkcjonuje jako zabezpieczenie przed wysokim wewnątrzkomórkowym poziomem 3,4-DHB [27].

Kwas protokatechowy oraz gwajakol, otrzymane w wyniku wstępnej transformacji kwasu wanilinowego, są następnie przekształcane do związków, które mogą zostać wykorzystane przez mikroorganizmy w metabolizmie podstawowym. W warunkach tlenowych pierścień aromatyczny kwasu protokatechowego jest rozszczepiany przy udziale 3,4-dioksygenazy, 2,3-dioksygenazy lub 4,5-dioksygenazy kwasu protokatechowego [16]. Transformacja gwajakolu przebiega natomiast z wytworzeniem katecholu jako podstawowego metabolitu pośredniego, którego pierścień aromatyczny jest rozszczepiany w szlaku *orto* lub *meta* przez dioksygenazykatecholowe [5].

2.3. Redukcja kwasu wanilinowego

Mikrobiologiczna redukcja kwasów karboksylowych jest procesem występującym powszechnie u licznych gatunków bakterii i grzybów. Zdolność do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego oraz kwasu ferulowego (rys. 1C, D, E), zaobserwowano m.in. u *Pycnoporus*



Rys. 2. Schemat redukcji kwasu wanilinowego (1) do waniliny (4), katalizowanej przez reduktazę kwasów karboksylowych (HS-CAR). (2) Wanilino-AMP, (3) Kowalencyjny metabolit pośredni.

cinnabarinus i szczepów z rodzaju *Nocardia*. Redukcję kwasu wanilinowego, podobnie jak innych kwasów karboksylowych, katalizuje reduktaza kwasów karboksylowych (Car) [4, 18, 38].

Reduktaza kwasów karboksylowych zawiera miejsce wiązania kwasu karboksylowego i ATP na N-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego oraz miejsce wiązania NADPH + H^+ i konserwatywną sekwencję, kodującą miejsce wiązania grupy fosfopantoteinowej koenzymu A w C-końcowej części enzymu. Podstawnik fosfopantoteinowy jest przenoszony z CoA, przez transferazę fosfopantoteinową, na resztę serynową, występującą wewnątrz sekwencji wiążącej. Reduktaza kwasów karboksylowych staje się w pełni funkcjonalnym holoenzymem, kiedy część białkowa enzymu przejdzie proces fosfopantoteinylacji [38].

Podstawowy mechanizm enzymatycznej redukcji kwasów karboksylowych jest dwuetapowy. Cykl enzymatyczny rozpoczyna się od aktywacji grupy karboksylowej przy udziale ATP, do wysoce reaktywnego karbonylo-AMP. Reszta sulfhydrylowa fosfopantoteinowej grupy prostetycznej reaguje z karbonylo-AMP, eliminując AMPi prowadząc do powstania tioestru, przez który pochodna kwasu karboksylowego jest kowalencyjnie przyłączana do Car. Tioester ulega następnie redukcji w C-końcowym fragmencie enzymu, przez NADPH + H^+, uwalniając odpowiedni aldehyd i wolną grupę sulfhydrylo-fosfopantoteinową Car, gotową do przeprowadzenia kolejnego cyklu. Schemat redukcji kwasu wanilinowego do waniliny przedstawiono na rysunku 2 [18, 38, 39].

Ze względu na przemysłowe znaczenie redukcji kwasu wanilinowego do waniliny prowadzone są liczne badania nad określeniem optymalnych warunków przebiegu procesu oraz możliwości stymulacji reakcji. L i i wsp. [18] opisali biotransformację kwasu wanilinowego prowadzoną przez szczep *Nocardia* sp. NRRL 5646. Wykazali, że rosnące bakterie przekształcały prawie cały kwas wanilinowy, dodany do pożywki w stężeniu 800 μg/ml, przed upływem 48 godzin do gwajakolu (69%) i alkoholu wanilinowego (11%). Efektywną produkcję waniliny osiągnęli, izolując reduktazę

kwasów karboksylowych i prowadząc redukcję w warunkach *in vitro* [18].

Do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego zdolny jest również rekombinowany szczep *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RP/pHAT305, u którego uzyskano ekspresję genów reduktazy kwasów karboksylowych (*car*) z *Nocardia* sp. NRRL 5646. Rekombinowane komórki *E. coli,* posiadające geny *car*, przy stężeniu 4 g/l kwasu wanilinowego, redukowały tylko 50% substratu do 0,1 g/l waniliny oraz 1,5 g/l alkoholu wanilinowego. Wzrost efektywności transformacji zaobserwowano, uzyskując dodatkowo ekspresję genu *ntp*, kodującego transferazę fosfopantoteinową, również pochodzącą z *Nocardia* sp. NRRL 5646. W tym przypadku redukcja była szybsza, około 80% dostarczonego kwasu wanilinowego ulegało transformacji w czasie 8 h i uzyskano 2,2 g/l waniliny oraz 0,5 g/l alkoholu wanilinowego. Najwyższą wydajność produkcji waniliny osiągnięto u *E. coli* BL21-Codon Plus®DE3)-RP/pPV2.85, zawierającej oprócz genów *car* i *ntp* dodatkowo *gdh*, gen kodujący glukozo-1-dehydrogenazę, pochodzącą z *Bacillus subtilis.* Ten szczep produkował maksymalną ilość waniliny w czasie 6 h [38].

Innym mikroorganizmem zdolnym do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego jest nitkowaty grzyb *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533. W warunkach naturalnych produkcja waniliny przez ten szczep jest jednak niska, a głównym metabolitem jest metoksyhydrochinon, produkt oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu wanilinowego. Wykazano jednak, że dodatek do pożywki celobiozy ogranicza produkcję metoksyhydrochinonu i wpływa na wzrost produkcji waniliny [4].

Opatentowano biotechnologiczny proces produkcji waniliny z rolnych produktów ubocznych. Wanilinę otrzymano w wyniku dwuetapowego procesu biotechnologicznego, łączącego biotransformację kwasu ferulowego z wysłodków buraczanych do kwasu wanilinowego przez *Aspergillus niger* oraz biotransformację uzyskanego kwasu wanilinowego do waniliny przez *Pycnoporus cinnabarinus.* Inne rolne produkty uboczne, takie jak otręby ryżowe, również mogą być tanim źródłem kwasu ferulowego. Produkt uboczny, powstający podczas produkcji oleju z otrębów ryżowych, może być wykorzystany jako źródło kwasu ferulowego, przez mieszaną populację grzybów *A. niger* CGMCC0774 i *P. cinnabarinus* CGMCC1115. Kwas ferulowy jest przekształcany w kwas wanilinowy przez *A. niger* CGMCC0774, a *P. cinnabarinus* CGMCC1115 redukuje kwas wanilinowy do waniliny [17].

3. Synteza kwasu wanilinowego

W związku ze wzrastającym zapotrzebowaniem na naturalny aromat wanilinowy w przemyśle spożywczym, a także ograniczeniami prawnymi uniemożliwiającymi stosowanie substancji syntetyzowanych chemicznie w aromatach naturalnych, pojawiło się duże zainteresowanie produkcją waniliny w procesach biotechnologicznych. Ponieważ kwas wanilinowy jest podstawowym substratem do produkcji waniliny, dlatego też istotne jest poznanie procesów biotechnologicznej syntezy i uwalniania tego związku z ligniny. Znane są zdolności mikroorganizmów do produkcji pochodnych kwasu hydroksybenzoesowego, m.in. kwasu wanilinowego z naturalnie występujących substratów, takich jak kwas ferulowy, eugenol i izoeugenol, na drodze biotransformacji.

3.1. Synteza kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego

Kwas ferulowy(KF) jest ważnym składnikiem ligniny, a wiele roślin, m.in. z rodziny *Poaceae,* jak np. jęczmień (*Hordeum*), pszenica (*Triticum*), owies (*Avena*) czy kukurydza (*Zea*), wykazuje zdolność do akumulacji dużych ilości KF w ścianach komórkowych, w formie wolnej lub w postaci kowalencyjnie związanej z biopolimerami, takimi jak polisacharydy, alkohole triterpenowe oraz sterole roślinne. KF występuje w dużych ilościach w tradycyjnych, bezwartościowych odpadach gospodarczych, takich jak otręby i wysłodki buraczane [12, 13, 24, 40].Wyizolowano wiele gatunków bakterii, drożdży, grzybów, a także glonów, zdolnych do syntezy kwasu wanilinowego, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, na drodze jednego z trzech podstawowych szlaków transformacji kwasu ferulowego, których podział opiera się na przebiegu pierwszej reakcji. W biotransformacji KF mogą również powstawać inne produkty, takie jak: wanilina, 4-hydroksy-3-metoksystyren, kwas *p*-kumarowy, alkohol wanilinowy oraz wanilinoamina [3, 6, 24, 36].

Pierwszy mechanizm transformacji kwasu ferulowego (rys. 1D) jest analogiczny do β-oksydacji kwasów tłuszczowych, i przebiega z wytworzeniem waniliny jako metabolitu pośredniego. Szlak ten jest zależny od CoA. Jednym z mikroorganizmów, zdolnym do wzrostu w obecności kwasu ferulowego, jako jedynego źródła węgla i energii, jest *Pseudomonas fluorescens*. Właściwości te stwierdzono u szczepów AN103 oraz BF13-97. *Pseudomonas fluorescens* BF13 wytwarzał 95% kwasu wanilinowego (6 g/l) z kwasu ferulowego w ciągu 5 godzin. Aby zwiększyć produkcję kwasu wanilinowego, stworzono linię mutantów inercyjnych, posiadających insert w genie *vanA*, kodującym α-podjednostkę demetylazy soli kwasu wanilinowego. Mutant ten został wykorzystany do przekształcania kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego, uzyskując 0,23 g kwasu wanilinowego na godzinę na 1 g biomasy. W badaniach przeprowadzonych nad szczepem AN103, maksymalne stężenie kwasu wanilinowego w medium hodowlanym, 0,55 g/l,

stwierdzono w 16 godzinie prowadzenia hodowli. W pożywce nie zaobserwowano akumulacji waniliny, co świadczy o tym, że *P. fluorescens* AN103 wykazuje wysoką wydajność utleniania tego metabolitu [8, 24].

Zbadano przebieg reakcji biotransformacji kwasu ferulowego, prowadzącej do otrzymania kwasu wanilinowego. Wykazano, że reakcja przeprowadzana przez *P. fluorescens* jest dwuetapowa i zależy jest od CoA, ATP oraz $MgCl_2$. Pierwszym etapem transformacji KF jest jego aktywacja do feruilo-CoA, przeprowadzana przez ligazę kwas ferulowy-CoA. Podlega on następnie reakcji rozszczepienia łańcucha bocznego, której produktami są wanilina oraz acetylo-CoA. Etap ten jest całkowicie zależny od CoA, ATP oraz $MgCl_2$ (rys. 1D). Szczep *P. fluorescens* AN103, w obecności wymienionych kofaktorów, transformował 32% wprowadzonego do pożywki KF do waniliny (18%) i kwasu wanilinowego (14%) przed upływem 4 godzin. Dłuższa inkubacja powodowała wzrost stężenia kwasu wanilinowego i spadek stężenia waniliny. Rozszczepienie KF, przy braku CoA oraz ATP, nie następowało, natomiast niedobór $MgCl_2$ zmniejszał (do 10%) szybkość reakcji odszczepienia łańcucha bocznego. Dehydrogenaza wanilinowa, utleniająca wanilinę do kwasu wanilinowego jest enzymem zależnym od NAD^+. Dodanie NAD^+ do pożywki zawierającej CoA, ATP oraz $MgCl_2$, powodowało u szczepu AN103 dwukrotne zwiększenie ilości przekształconego kwasu ferulowego (do 68%), a głównym produktem rozpadu był wówczas kwas wanilinowy [24].

Ghosh i wsp. [13], badając *Paecilomyces variotii* MTCC, wykazali, że grzyby te degradują KF do kwasu wanilinowego na drodze tego samego szlaku przemian, co bakterie z gatunku *P. fluorescens* i osiągnęli maksymalne stężenie kwasu wanilinowego, 115 mg/l, stosując 10 mM KF w pożywce, po 16 dniach inkubacji. Wyższą wydajność transformacji KF do kwasu wanilinowego zaobserwowano u *Streptomyces sannanensis* MTC 6637, a maksymalne stężenie kwasu wanilinowego, 400 mg/l, uzyskano, po 16 dniach prowadzenia hodowli, stosując jako źródło węgla KF w stężeniu 5 mM. Ilość kwasu wanilinowego utrzymywała się w pożywce przed długi czas na stałym poziomie, co pozwoliło na stwierdzenie, że szczep ten nie jest zdolny do dalszej transformacji kwasu wanilinowego [12]. Tripathi i wsp. [36] prowadząc badania nad *Haematococcus pluvialis* uzyskali maksymalną produkcję kwasu wanilinowego, 5,4 mg/l, w trzecim dniu prowadzenia hodowli, stosując w pożywce 1 mM KF i wykorzystując komórki immobilizowane. Wykazali, że algi te zdolne są do transformacji KF do szeregu związków, występujących w aromacie wanilinowym, takich jak kwas wanilinowy, alkohol wanilinowy, kwas protokatechowy, kwas *p*-hydrobenzoesowy, aldehyd *p*-hydrobenzoesowy oraz kwas *p*-kumarowy. Reakcja transformacji KF do kwasu wanilinowego przebiegała szlakiem zależnym od CoA. Podobny szlak przemian zaobserwowano u *Rhodotorula rubra*, gdzie dodatek CoA, ATP i NAD^+ do ekstraktu komórkowego był niezbędny w konwersji kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego. Badania wykazały, że po 22 h prowadzenia hodowli 90% wszystkich produktów biotransformacji KF stanowił kwas wanilinowy, obserwowano jednak dalszą transformację kwasu wanilinowego do gwajakolu, kwasu protokatechowego i 4-hydroksy-3-metoksystyrenu [15].

W drugim szlaku syntezy kwasu wanilinowego z KF (rys. 1E) pierwszym etapem jest rozszczepienie C_1 łańcucha bocznego KF, przeprowadzane przez dekarboksylazę kwasu ferulowego, z wytworzeniem 4-hydroksy-3-metoksystyrenu (4-winylogwajakolu). Zaproponowany mechanizm dekarboksylacji obejmuje wstępną reakcje izomeryzacji kwasu ferulowego do pochodnej chinonu, która następnie ulega samorzutnej dekarboksylacji. Mechanizm ten jest zgodny z obserwacją, że grupa *p*-hydroksylowa jest niezbędna do procesu dekarboksylacji. 4-winylogwajakol ulega następnie przekształceniu w kwas wanilinowy, który w wyniku nieoksydacyjnej dekarboksylacji przechodzi w gwajakol. Przemiany te nie są zależne od CoA [35].

Topakas i wsp. [35] przeprowadzili badania nad termofilnym grzybem *Sporotrichum termophile*. Wykazali, że u tego mikroorganizmu, produkcja kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego zachodzi poprzez degradację łańcucha propionowego, z wytworzeniem 4-winylogwajakolu. W przeprowadzonych badaniach osiągnęli maksymalną wydajność syntezy kwasu wanilinowego, 4024 mg/l, hodując grzyby przez pierwsze 3 dni w pożywce zawierającej glukozę jako źródło węgla, a następnie dodając KF w stężeniu 60 mM. Kwas wanilinowy, otrzymany w wyniku transformacji, jest produktem nietrwałym, obserwowano więc jego nieoksydacyjną dekarboksylację do gwajakolu, zanim produkcja kwasu wanilinowego osiągnęła maksimum [24, 35]. Przemiany kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego, przebiegające z wytworzeniem 4-winylogwajakolu jako metabolitu pośredniego, stwierdzono również u grzybów białej zgnilizny *Schizophyllum commune* [37].

W komórkach *Polyporus versicolor* podczas degradacji kwasu ferulowego, obok 4-winylogwajakolu wykryto również kwas wanilinowy, wanilinę, alkohol wanilinowy, gwajakol oraz katechol, a w komórkach szczepów *Paecilomyces variotii* i *Pestalotia palma rum* wykazano również metoksyhydrochinon jako produkt oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu wanilinowego. *Bacillus coagulans* BK07 przeprowadzał dekarboksylację kwasu ferulowego do 4-winylogwajakolu, który był natychmiast konwertowany do waniliny i utleniany do kwasu wanilinowego. Kwas wanilinowy z kolei ulegał demetylacji do kwasu protokatechowego [29].

Trzeci mechanizm syntezy kwasu wanilinowego (rys. 1F) polega na skróceniu łańcucha bocznego kwasu

ferulowego, w wyniku czego powstaje kwas dihydroferulowy (kwas 4-hydroksy-3-metoksyfenylopropionowy). Redukcja łańcucha bocznego rozpoczyna się od ataku kationu wodorkowego, pochodzącego z pochodnej chinonu, zainicjowanego przez izomeryzację analogiczną do tej zachodzącej podczas dekarboksylacji kwasu ferulowego. Reakcja ta jest typowa dla organizmów beztlenowych, takich jak *Burkholderia cepacia*, *Wolinella succinogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Lactobacillus plantarum*. Reakcja ta zachodzi jednak również w warunkach tlenowych i przeprowadzana jest przez *Phanerochaete chrysosporium* i *Pseudomonas fluorescens* FE2. U *Wolinella succinogenes* kwas dihydroferulowy jest metabolizowany do kwasu wanilinowego, *p*-karboksymetylofenolu i kwasu homowanilinowego. U *P. fluorescens* zaobserwowano szlak przechodzący przez kwas wanilinowy i protokatechowy [26, 29].

3.2. Synteza kwasu wanilinowego z eugenolu i izoeugenolu

Proces otrzymywania kwasu wanilinowego oraz waniliny na drodze biotransformacji kwasu ferulowego jest najbardziej powszechny, a zdolność do tej transformacji wykazuje wiele mikroorganizmów. Zidentyfikowano jednak szczepy bakteryjne produkujące kwas wanilinowy z innych, tańszych pochodnych fenolu, takich jak eugenol oraz izoeugenol (rys. 1G, H). Eugenol oraz izoeugenol są składnikami olejków eterycznych. Eugenol może być otrzymywany na skalę przemysłową z drzewa goździkowego *Syzygium aromaticum* [27, 32].

Eugenol jest silnie toksyczny dla większości bakterii, istnieją jednak szczepy zdolne do jego biotransformacji. Do bakterii transformujących eugenol należą m.in. różne szczepy *Pseudomonas*, które posiadają oksydazę eugenolową, enzym odpowiedzialny za pierwszy etap rozkładu, prowadzący do otrzymania alkoholu koniferylowego. Reakcję tą może również katalizować oksydaza alkoholu wanilinowego, enzym obecny m.in. u *Penicillum simplicissimum*. Alkohol koniferylowy ulega następnie utlenieniu do aldehydu koniferylowego, w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholu koniferylowego. Dehydrogenaza aldehydu koniferylowego katalizuje kolejną reakcję, w wyniku której powstaje kwas ferulowy. KF jest przekształcany w wanilinę oraz kwas wanilinowy w szlaku zależnym od CoA [27]. Przemiany eugenolu prowadzące do kwasu ferulowego, a następnie kwasu wanilinowego przedstawiono na rysunku 1C, D i G.

O v e r h a g e i wsp. [27] wyizolowali szczep *Escherichia coli* XL1-Blue, tolerujący eugenol. Konstruując plazmid zawierający geny oksydazy alkoholu wanilinowego, dehydrogenazy alkoholu koniferylowego oraz dehydrogenazy aldehydu koniferylowego, pochodzące z *Penicillum simplicissium* CBS 170.90, a następnie transformując nim wyizolowany szczep *E. coli*, uzyskali wydajną transformację eugenolu do kwasu ferulowego. Dalszą przemianę KF uzyskali transformując ten sam szczep *E. coli* genami kodującymi ligazę kwas ferulowy-CoA oraz hydratazę enoilo-CoA [27].

Pseudomonas putida I58 i *Bacillus subtilis* B2 są szczepami bakteryjnymi, transformującymi izoeugenol do kwasu wanilinowego. Wykazano, że bakterie te wykorzystują wanilinę oraz kwas wanilinowy jako źródło węgla, natomiast alkohol koniferylowy, aldehyd koniferylowy i KF, które są intermediatami transformacji eugenolu, nie były rozkładane. Wyniki te sugerują, że izoeugenol jest bezpośrednio przekształcany w wanilinę, bez wytwarzania kwasu ferulowego [10]. Transformacja izoeugenolu do kwasu wanilinowego, przeprowadzana przez *P. putida* I58 była bardziej efektywna niż u *B. subtilis* B2. Komórki szczepu *P. putida*, rosnące w optymalnej pożywce, zawierającej 5 g/l izoeugenolu, przekształcały izoeugenol do kwasu wanilinowego z wydajnością 98% przed upływem 40 minut. W pożywce zidentyfikowano znikome ilości waniliny. *B. subtilis* przeprowadzał tą reakcję wolniej, a maksymalna ilość waniliny osiągana była po 24 godzinach hodowli. Wydajność transformacji izoeugenolu do waniliny w optymalnych warunkach wynosiła 14%. Obserwowano późniejsze utlenianie waniliny do kwasu wanilinowego [10, 32].Transformację izoeugenolu do waniliny zaobserwowali również S e s h a r d i i wsp. [31] u szczepu *Nocardia iowensis*. W pierwszym etapie izoeugenol jest przekształcany przy udziale monooksygenazy izoeugenolu do epoksydu (rys. 1H), który jest hydrolizowany do diolu, a następnie transformowany do waniliny (rys. 1I).

4. Podsumowanie

W pracy przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy na temat mikrobiologicznych przemian kwasu wanilinowego. Podstawową reakcją rozkładu kwasu wanilinowego jest jego demetylacja do kwasu protokatechowego. U bakterii zidentyfikowano dwa różne szlaki, którymi może przebiegać ta reakcja, oksydacyjny, zależny od NAD(P)H oraz nieoksydacyjny, w którym kofaktorem jest tetrahydrofolian. Inną ważną przemianą kwasu wanilinowego jest reakcja nieoksydacyjnej dekarboksylacji do gwajakolu. Dekarboksylaza kwasu wanilinowego, enzym katalizujący tą przemianę, nie wymaga żadnych kofaktorów.

Największe znaczenie przemysłowe ma jednak redukcja kwasu wanilinowego do waniliny. Ten dwuetapowy proces ten występuje powszechnie u licznych gatunków bakterii i grzybów. Reduktaza kwasów karboksylowych wymagana do pełnej aktywności obecności ATP, CoA oraz NADPH. Z punktu widzenia syntezy waniliny, istotne jest poznanie szlaków biosyntezy jej

prekursora z innych naturalnych, powszechnie występujących związków. Kwas wanilinowy otrzymuje się najczęściej na drodze biotransformacji kwasu ferulowego, ważnego składnika ligniny. Reakcja ta może przebiegać dwoma alternatywnymi szlakami. Pierwszy z nich, zależny od CoA, przebiega z wytworzeniem waniliny jako metabolitu pośredniego i jest charakterystyczny dla wielu szczepów bakterii, grzybów oraz alg. Drugi szlak biosyntezy kwasu waniliowego z kwasu ferulowego polega na dwukrotnej dekarboksylacji, której intermediatem jest 4-hydroksy-3-metoksystyren. Zidentyfikowano również szczepy mikroorganizmów produkujące kwas waniliowy z innych pochodnych fenolu, takich jak eugenol oraz izoeugenol. Transformacja eugenolu przebiega z wytworzeniem kwasu ferulowego, natomiast izoeugenol jest bezpośrednio transformowany do waniliny.

Piśmiennictwo

1. Abe T., Masai E., Miyauchi K., Katayama Y., Fukuda M.: A tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonaspaucimobilis*SYK-6. *J. Bacteriol.* **187**, 2030–2037 (2005)
2. Alvarez-Rodriguez M.L., Belloch C., Villa M., Uruburu F., Larriba G., Coque J.J.R.: Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 49–55 (2003)
3. Ashengroph M., Nhavi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbik E.: Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. *Ann. Microbiol.* **62**, 553–558 (2012)
4. Bonnin E., Lesage-Meessen L., Asther M., Tibault J.F.: Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of natural cellobiose. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 484–486 (1999)
5. Bykova M.V., ErmakovD.Yu., Kaichev V.V., Bulavchenko O.A., Saraev A.A., Lebedev M.Yu., Yakovlev V.A.: Ni-based sol-gel catalysts as promising system for crude bio-oil upgrading: guaiacol hydrodeoxygenation study. *Appl. Catal. B: Environ.* **113–114,** 296–307 (2012)
6. Chamkha M., Record E., Garcia J.-L., Asther M. L., Labat M.: Isolation from a shea cake digester of a tannin-tolerant *Escherichia coli* strain decarboxylating *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids. *Curr. Microbiol.* **44**, 341–349 (2002)
7. Chow K.T., Pope M.K., Davies J.: Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7. *Microbiology*, **145**, 2393–2403 (1999)
8. Civolani C., Barghini P., Roncetti A.R., Ruzzi M., Schiesser A.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* Strain BF13. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2311–2317 (2000)
9. Dhar A., Lee K.S., Dhar K., Rosazza J.P.N.: *Nocardia* sp. vanillic acid decarboxylase. *Enzyme. Microbial. Technol.* **41**, 271–177 (2007)
10. Furukawa H., Morita H., Yoshida T., Nagasawa T.: Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* 158 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 401–403 (2003)
11. Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność*, **4**, 29–40 (2004)
12. Ghosh S., Sachan A., Kumar Sen S., Mitra A.: Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 131–138 (2007)
13. Ghosh S., Sachan A., Mitra A.: Research communications – Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Curr. Sci.* **90**, 825–829 (2006)
14. Harborne J.B.: Ekologia biochemiczna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997
15. Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N.: Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23954–23958 (1993)
16. Karegoudar T.B., Kim C-K.: Microbial degradation of monohydroxybenzoic acids. *J. Microbiol.* **38**, 53–61 (2000)
17. Lesage-Meessen L., Delattre M., HaonM., Thibault J.F., Ceccaldi B.C., Brunerie P., Asther M.: Two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Biotechnol.* **50**, 107–113 (1996)
18. Li T., Rosazza J.P.N.: Biocatalytic synthesis of vanillin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 684–687 (2000)
19. Masai E., Katayama Y., Nishikawa S., Fukuda M.: Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 364–373 (1999)
20. Mattila P., Hellstrom J.: Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J. Food Compos. Anal.* **20,** 152-160 (2007)
21. McMurry J.: Chemia organiczna. Część I, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2000, s. 573
22. Mitsui R., Kusano Y., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N., Tanaka M.: Formaldehyde fixation contributes to detoxification for growth of a nonmethylotroph, *Burkholderia cepacia* TM1, on vanillic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6128–6132 (2003)
23. Morawski B., Segura A., Ornston L.N.: Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* **182**, 1383–1389 (2000)
24. Narbad A., Gasson M.J.: Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, **144**, 1397–1405 (1998)
25. Nishimura M., Ooi O., Davies J.: Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. NL15-2K capable of degrading lignin-related aromatic compounds. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 124–127 (2006)
26. Noor Hasyierah M.S., Zulkali M.M.D., Ku Syahidah K.I.: Ferulic acid from lignocellulosic biomass: Review. Proceedings of MUCET 2008, Putra Brasmana, Perlis, Malaysia
27. Overhage J., Steinbuchel A., Priefert H.: Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6569–6576 (2003)
28. Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuchel A.: Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.* **179**, 2595–2607 (1997)
29. Priefert H., Rabenhorst J., Steinbüchel A.: Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 296–314 (2001)
30. Providenti M.A., O'brien J.M., Ruff J., Cook A.M., Lambert I.B.: Metabolism of isovanillate, vanillate, and veratrate by *Comamonas testosterone* strain BR6020. *J. Bacteriol.* **188**, 3862–3869 (2006)
31. Seshadri R., Lamm A.S., Khare A., Rosazza J.P.N.: Oxidation of isoeugenol by *Nocardia iowensis*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **43**, 486–494 (2008)
32. Shimoni E., Ravid U., Shoham Y.: Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J. Biotech.* **78**, 1–9 (2000)

33. Szwajgier D., Pielecki J., Targoński Z.: Antioxidant activities of cinnamic and benzoic acid derivatives. *Acta Sci. Pol.* **4**, 129–142 (2005)
34. Tai A., Sawano., Yazama F.: Antioxidant properties of ethyl vanillin *in vitro* and *in vivo. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 2346–2350 (2011)
35. Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sportrichum thermophile*. *Lebensm.-Wissu.-Technol.* **36**, 561–565 (2003)
36. Tripathi U., Rao S.R., Ravishankar G.A.: Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochem.* **38**, 419–426 (2002)
37. Tsuijyama S. Ueno M.: Formation of 4-vinyl guaiacolas an intermediate in bioconversion of ferulic acid by *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 212–215 (2008)
38. Venkitasubramanian P., Daniels L., Das S., Lamm A.S., Rosazza J.P.N.: Aldehyde oxidoreductase as a biocatalyst: Reductions of vanillic acid. *Enzyme Microbial. Technol.* **42**, 130–137 (2008)
39. Venkitasubramanian P., Daniels L., Rosazza J.P.N.: Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**, 478–485 (2007)
40. Zheng L., Zheng P., Sun Z., Bai Y., Wang J., Guo X.: Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour. Technol.* **98**, 1115–1119 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 35–42
http://www.pm.microbiology.pl

BEZTLENOWE ZIARENKOWCE GRAM-DODATNIE (GPAC) – DIAGNOSTYKA I ZNACZENIE KLINICZNE

Marta Kierzkowska[1, 2]*, Anna Majewska[1, 2], Anna Sawicka-Grzelak[1, 2], Grażyna Młynarczyk[1, 2]

[1] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
[2] Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Systematyka beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich. 3. Znaczenie kliniczne GPAC. 4. Diagnostyka laboratoryjna. 4.1. Hodowla. 4.2. Identyfikacja fenotypowa. 4.3. Identyfikacja genotypowa. 5. Podsumowanie

Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) – diagnostic and clinical significance

Abstract: Among the Gram-positive anaerobic bacteria associated with clinical infections, the Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) are the most predominant and account for approximately 25–30% of all isolated anaerobic bacteria from clinical specimens. They can be cultured from a wide variety of sites, particularly abscesses and infections of the mouth, skin and soft tissues, bone and joints and upper respiratory and female genital tracts. Most infections involving GPAC are polymicrobial. Still, routine culture and identification of these slowly growing anaerobes to the species level has been limited in the diagnostic laboratory, mainly due to the requirement of prolonged incubation times and time-consuming phenotypic identification. The development of molecular methods such as PCR, multiplex PCR, sequencing of the 16S rRNA gene have led to improved identification of GPAC. In recent years, MALDI-TOF MS has been implemented in routine laboratories and utilized as a completely new approach for the identification of bacteria. Data from molecular methods have led to extensive taxonomic changes during the last decades and also to the occurrence of new genera and species. This review describes clinical significance of GPAC and virulence factors one of the most pathogenic species – *Finegoldia magna*.

1. Introduction. 2. Taxonomy of Gram-positive anaerobic cocci. 3. Clinical significance of GPAC. 4. Laboratory diagnostic. 4.1. Culture. 4.2. Phenotypic identification. 4.3. Genotypic identification. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Finegoldia magna*, GPAC, MALDI-TOF MS, sekwencjonowanie 16S rRNA
Key words: *Finegoldia magna,* GPAC, MALDI-TOF MS, sequence analysis 16S rRNA

1. Wstęp

Bakterie beztlenowe po raz pierwszy zaobserwował Louis Pasteur w 1861 roku opisując martwe drobnoustroje na obrzeżu preparatu przyżyciowego, podczas gdy bakterie w centralnej części preparatu pozostawały aktywne. Pasteur określił bakterie żyjące bez dostępu tlenu jako „anaerobies". Rosnące beztlenowo ziarenkowce zostały po raz pierwszy opisane w 1893 r. przez Veillon [34]. Wykryty szczep wyizolowano z czystej hodowli w przebiegu ropnego zapalenia gruczołu Bartholina. W latach 1888–1916 w literaturze opisano ponad 300 metod generowania warunków beztlenowych (odtleniania) umożliwiających hodowanie drobnoustrojów w warunkach *in vitro* [34].

Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie (Gram-positive anaerobic cocci – GPAC) stanowią około 25–30% bakterii beztlenowych izolowanych z próbek materiałów klinicznych [21]. Drobnoustroje te często są pomijane w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. Niewątpliwie ma to związek z wydłużonym czasem generacji (czasochłonna hodowla i identyfikacja). Ponadto GPAC wchodzą w skład fizjologicznej mikroflory skóry i błon śluzowych i najczęściej są izolowane z zakażeń mieszanych [25].

W poprzednich latach identyfikację bakterii beztlenowych prowadzono na podstawie morfologii kolonii na podłożu agarowym, obserwacji mikroskopowej komórek i ich układów w preparatach barwionych metodą Grama oraz przy użyciu szeregów biochemicznych. Identyfikacja na podstawie biochemicznej i metabolicznej charakterystyki szczepu jest procesem długotrwałym i nie zawsze daje zadawalające wyniki. Obecnie istnieje możliwość identyfikowania drobnoustrojów na podstawie analizy białek rybosomalnych za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS. Skrócenie czasu identyfikacji bakterii beztlenowych uzyskano także po wprowadzeniu nowoczesnych metod biologii molekularnej takich jak PCR, multiplex PCR, sekwencjonowanie genu 16S rRNA oraz mikromacierzy. Metody genetyczne są szybkie, wysoce swoiste i czułe [28, 29, 39]. Udoskonalenie metod badawczych, oprócz umożliwienia szybszej i precyzyjniejszej identyfikacji, doprowadziło do konieczności dokonania istotnych zmian w nomenklaturze GPAC. Istniejące gatunki przemianowano, a nowe zostały dodane, w wyniku czego pojawiły się zmiany w nomenklaturze. Obecnie w piśmiennictwie coraz częściej prezentowane są wyniki badań wskazujące na udział GPAC w etiologii zakażeń, jednocześnie wzrasta częstość izolacji tych bakterii z materiałów

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. T. Chałubińskiego 5; 02-004 Warszawa; tel. 22 62 82739, e-mail: marta.kierzkowska@wum.edu.pl

klinicznych. Istnieje więc potrzeba precyzyjnej identyfikacji izolowanych szczepów oraz poznania ich czynników wirulencji i profilu wrażliwości na antybiotyki.

Do najważniejszych beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich (GPAC), izolowanych z próbek materiałów klinicznych od ludzi, należą rodzaje *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus*.

2. Systematyka beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich

Na przestrzeni lat dokonano istotnych zmian taksonomicznych w obrębie GPAC. Początkowo bakterie na podstawie morfologii nazwane były beztlenowo rosnącymi paciorkowcami – rodzaj *Peptostreptococcus* oraz beztlenowo rosnącymi gronkowcami – rodzaj *Peptococcus* należących do rodziny *Peptococcaceae*. W 1983 roku przekwalifikowano gatunki należące do GPAC. Analizy dokonano na podstawie składu zasad DNA, hybrydyzacji DNA-DNA, produkcji kwasów tłuszczowych oraz innych reakcji biochemicznych. W rodzaju *Peptococcus* pozostał tylko gatunek *Peptococcus niger*, a gatunki *P. asaccharolyticus*, *P. indolicus*, *P. prevotii* i *P. magnus* zostały przyporządkowane do rodzaju *Peptostreptococcus* [7, 9]. Przez kolejne lata dokonywano wielu badań przedstawicieli poszczególnych gatunków i ostatecznie na podstawie analizy genu 16S rRNA uporządkowano systematykę ziarenkowców beztlenowo rosnących. W 1998 roku rodzaj *Peptostreptococcus* został podzielony, wyodrębniono nowe rodzaje – *Finegoldia* i *Micromonas* [24], po czym rodzaj *Micromonas* reklasyfikowano na *Parvimonas* [31]. W 2001 E z a k i i wsp. [8] wyodrębnili w obrębie GPAC trzy nowe rodzaje – *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Gallicola*. Z kolei rodzaj *Ruminococcus* został zamieniony na rodzaj *Blautia* [20]. W latach 2009–2010 zostały utworzone dwa kolejne rodzaje *Anaerosphaera* [32] i *Murdochiella* [33]. Poniżej przedstawiono aktualnie obowiązującą systematykę GPAC, w której zostały wymienione również gatunki odkryte i nazwane w latach 2012–2013.

Ziarenkowce Gram-dodatnie
- **Rodzina**: *Peptococcaceae*
  - **Rodzaj**: *Peptococcus*
    - **Gatunek**: *P. niger*
  - **Rodzina**: *Peptostreptococcaceae*
    - **Rodzaj**: *Peptostreptococcus*
      - **Gatunki**: *P. anaerobius*, *P. russellii*, *P. stomatis*
    - **Rodzaj**: *Anaerosphaera*
      - **Gatunek**: *A. aminiphila*

Clostridiales Rodzina XI. Incertae Sedis:
- **Rodzaj**: *Anaerococcus*
  - **Gatunki**: *A. hydrogenalis*, *A. lactolyticus*, *A. murdochii*, *A. octavius*, *A. prevotii*, *A. tetradius*, *A. vaginalis*
- **Rodzaj**: *Blautia*
  - **Gatunek**: *B. producta*
- **Rodzaj**: *Gallicola*
  - **Gatunek**: *G. barnesae*
- **Rodzaj**: *Murdochiella*
  - **Gatunek**: *M. asaccharolytica*
- **Rodzaj**: *Parvimonas*
  - **Gatunek**: *P. micra*
- **Rodzaj**: *Peptoniphilus*
  - **Gatunki**: *P. asaccharolyticus*, *P. coxii*, *P. duerdenii*, *P. gorbachii*, *P. harei*, *P. indolicus*, *P. ivorii*, *P. koenoeneniae*, *P. lacrimalis*, *P. methioninivorax*, *P. olsenii*, *P. tyrrelliae*
- **Rodzaj**: *Finegoldia*
  - **Gatunek**: *F. magna*
- **Rodzina**: *Coriobacteriaceae*
  - **Rodzaj**: *Atopobium*
    - **Gatunek**: *A. parvulum*

3. Znaczenie kliniczne GPAC

Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie stanowią około 1/3 wszystkich bakterii beztlenowych izolowanych z próbek materiałów klinicznych [21, 25]. GPAC to część prawidłowej mikroflory u ludzi. Ta zróżnicowana grupa drobnoustrojów kolonizuje różne partie ciała, przede wszystkim skórę i powierzchnię błon śluzowych jamy ustnej oraz przewód pokarmowy i dolne odcinki układu moczowo-płciowego u kobiet [22, 25]. Przy każdym zaburzeniu panującej równowagi komensale te mogą uczestniczyć w procesie infekcyjnym w miejscu swojego naturalnego bytowania. Zakażenia występują również wskutek translokacji drobnoustrojów z miejsc naturalnego bytowania do miejsc, które z natury są jałowe. Jest to zwykle skutek stosowania inwazyjnych zabiegów medycznych, ale może mieć miejsce również na skutek wielu innych przyczyn. Zakażenia mogą dotyczyć każdej tkanki i narządu. GPAC często są obecne w zakażeniach głębokich tkanek miękkich, kości i stawów, w infekcjach żeńskich dróg płciowych, zakażeniach stomatologicznych oraz górnych i dolnych dróg oddechowych [3, 17]. Z materiału pobranego w przebiegu ropniaka opłucnej izolowano *Paravimonas micra*, ale również *Finegoldia magna*, *Peptostrepcoccus anaerobius* i *Anaerococcus vaginalis*, przy czym GPAC stanowiły 26,3% wśród beztlenowych bakterii izolowanych z tego typu materiałów [2]. Wykazano również obecność GPAC w próbkach materiałów pobranych w ostrych i przewlekłych zakażeniach ran (np. przewlekłe owrzodzenia). Bakterie te i ich metabolity mogą znacznie upośledzać procesy prawidłowego gojenia ran [30, 37]. Szczepy te najczęściej izolowane są z materiałów klinicznych wraz z mikroflorą tlenową lub innymi bakteriami beztlenowymi. Wykazano, że w takich wielogatunkowych zakażeniach

bakterie oddziałują na siebie w sposób synergistyczny, wikłając przebieg infekcji. Powoduje to obniżenie potencjału oksydoredukcyjnego w tkankach, ochronę przed fagocytozą i potęguje zdolność do tworzenia ropni. Wiele zakażeń o przebiegu przewlekłym, np. owrzodzenia, odleżyny, stopa cukrzycowa, związanych jest z kolonizacją rany przez bakterie wytwarzające biofilm. Ta wielokomórkowa struktura chroni drobnoustroje przed reakcjami obronnymi układu odpornościowego gospodarza i stanowi istotną barierę uniemożliwiającą penetrację antybiotyku [13, 37]. W 2011 r. H a n i wsp. [13] wykazali, że w zakażeniach ran, oprócz bakterii tlenowych, takich jak *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, uczestniczą także beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie, głównie *Peptoniphilus* sp., *Finegoldia* sp. i *Anaerococcus* sp. Biorąc pod uwagę odmienne czynniki wirulencji u różnych rodzajów GPAC (*Finegoldia*, *Parvimonas*) prawidłowa identyfikacja drobnoustrojów do poziomu gatunku izolowanych z materiałów klinicznych staje się bardzo ważna. W wielu przypadkach GPAC występują w zakażeniach jednogatunkowych, należy tu wymienić głównie *Finegoldia magna*, ale także: *P. micra*, *P. harei*, *P. anaerobius* [38].

Kliniczne znaczenie beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich było niezauważane, z uwagi na to, że wyniki badania uzyskuje się dopiero, gdy leczenie empiryczne zostało rozpoczęte, często z pozytywnym skutkiem terapeutycznym. Ponadto identyfikacja poszczególnych gatunków GPAC jest pomijana w laboratoriach diagnostycznych z powodu trudności laboratoryjnych (przedłużona hodowla, specjalne wymagania atmosferyczne i odżywcze, wielogatunkowe zakażenia).

Finegoldia magna

F. magna jest najbardziej patogennym i najczęściej występującym gatunkiem GPAC izolowanym z różnych materiałów klinicznych [3, 22, 38]. Wchodzi w skład mikroflory przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego oraz jamy ustnej i skóry. W większości przypadków drobnoustrój jest uważany za zanieczyszczenie próbek materiału klinicznego, a nie czynnik etiologiczny zakażenia [26]. Dane z piśmiennictwa wskazują jednak na istnienie wielu różnych zakażeń wywołanych przez *F. magna,* dotyczących przede wszystkim infekcji tkanek miękkich, ran, kości i stawów oraz zakażeń związanych z obecnością endoprotez. Opisano również rzadziej występujące zakażenia, takie jak: ropniak opłucnej i zapalenie wsierdzia [2, 10, 26].

U *F. magna* opisano wiele czynników wirulencji, do najważniejszych należą omówione poniżej: białka L, PAB (peptostreptococcal albumin binding protein), SufA (subtilisin-like proteinase) i FAF (*F. magna* adhesion factor) oraz kolagenaza i zdolność wytwarzania biofilmu.

W 1988 roku B j ö r c k [1] pierwszy opisał białko powierzchniowe ściany komórkowej (białko L), zdolne do wiązania się ze wszystkimi klasami ludzkich immunoglobulin. Białko L ma powinowactwo do IgG, IgM, IgA. Jest także zdolne do wiązania się z domeną κ lekkiego łańcucha IgE, co stymuluje uwalnianie histaminy z komórek tucznych i z zasadochłonnych granulocytów, wywołując reakcje zapalne. Zauważono obecność białka L u *F. magna* w próbkach materiałów pochodzących z żeńskich narządów płciowych z podejrzeniem bakteryjnej waginozy [22]. Struktura białka L jest podobna do białka A gronkowców i białka G paciorkowców. Białko L jest znacznie mniejsze od białka G, co ułatwia penetrację tkanek. Wszystkie te białka posiadają wiele kopii wysoce konserwatywnych domen wiążących Ig [12]. D e C h â t e a u i B j ö r c k [4] wykazali, że niektóre szczepy *F. magna* wytwarzają powierzchniowe białka PAB (peptostreptococcal albumin binding protein), zdolne do wiązania białek surowicy ludzkiej (HSA – human serum albumin). PAB zawiera niepowtarzające się domeny, w przeciwieństwie do większości innych białek powierzchniowych bakterii Gram-dodatnich, w tym białek L i G. Szczepy *F. magna* zawierające białka PAB cechuje wzmożona patogenność, większość tych szczepów została wyizolowana z materiałów od pacjentów z różnie umiejscowionym zakażeniem ropnym. Spośród 30 badanych szczepów, u 16 stwierdzono zdolność do wiązania znacznej ilości HSA. Natomiast szczepy wyizolowane z pochwy oraz określone, jako komensale nie wykazały powinowactwa do HSA. Wskazuje to na związek pomiędzy zdolnością wiązania albumin, a infekcjami o ropnym przebiegu. W związku z tym białka PAB odgrywają istotną rolę w zwiększaniu zjadliwości bakterii w procesie infekcyjnym. Ponadto szczepy zdolne do generowania białek PAB, nie są zdolne do wytwarzania białek L, wiążących lekkie łańcuchy Ig, co sugeruje, że lokalizacja i przebieg zakażenia zależny jest od określonych właściwości wirulentnych bakterii [5]. SufA (subtilisin-like proteinase) to proteinaza, która degraduje fibrynogen w ludzkim osoczu. Wykazano, że SufA opóźnia tworzenie się sieci włóknika wokół *F. magna*, która przylega do ludzkich keratynocytów i ułatwia zapoczątkowanie infekcji [14, 15]. Podczas rozpadu fibrynogenu uwalniane są fibrynopeptydy (FPA, FPB), które działają chemotaktycznie na neutrofile, makrofagi, fibroblasty. Ekspresja SufA może upośledzać gojenie się ran [30]. Białko FAF (*F. magna* adhesion factor) jest wytwarzane przez ponad 90% szczepów. Struktura i funkcje podobne są do białka M *Streptococcus pyogenes*. FAF występuje w znacznej ilości na powierzchni komórki bakteryjnej, ale jest też uwalniane na zewnątrz. Białko to ma cechy typowe dla innych białek powierzchniowych bakterii Gram-dodatnich. FAF uczestniczą w interakcjach pomiędzy bakteriami w organizmie człowieka, umożliwiając kolonizację i przetrwanie *F. magna* w organizmie ludzkim. Wykazano, że białko FAF indukuje agregację bakterii. Badania

nad biologicznymi funkcjami tego czynnika patogenności są jeszcze na wstępnym etapie [11]. Niektóre szczepy *F. magna* (w zależności od miejsca zakażenia) wydzielają kolagenazę. Stwierdzono, że szczepy *F. magna* wyizolowane z nieropnego zapalenia gruczołu sutkowego i stopy cukrzycowej, wytwarzają kolagenozę w wyższych stężeniach w porównaniu ze szczepami wyizolowanymi z zakażeń w obrębie jamy brzusznej [18]. Kolagen obficie występuje w skórze, ścięgnach, tkance chrzęstnej; jest składnikiem organicznym kości, zębów i rogówki. Uszkodzenie kolagenu powoduje utratę integralności tkanek i postęp choroby. Jego produkcja jest ważna dla wzrostu bakterii asacharolitycznych. Podczas rozpadu kolagenu uwalniane są aminokwasy niezbędne do wzrostu i przeżycia drobnoustroju [18].

W 2012 r. D o n e l l i [6] opisał zdolność *F. magna* do tworzenia biofilmu. Gatunek ten wykazuje silną adhezję i może uczestniczyć w tworzeniu biofilmu z udziałem innych bakterii beztlenowych, np. *Bacteroides fragilis* i *Clostridium difficile*. Biofilm zabezpiecza mikroorganizmy przed komórkami układu immunologicznego oraz stanowi barierę dla antybiotyków [37].

4. Diagnostyka laboratoryjna

Identyfikacja bakterii beztlenowych stanowi dla bakteriologów klinicznych jedno z najtrudniejszych wyzwań. Znanych jest wiele metod umożliwiających ich detekcję w materiałach od pacjentów z podejrzeniem choroby infekcyjnej. Niektóre z nich zostały wyparte przez intensywnie rozwijające się techniki molekularne. W niniejszej pracy zostały szerzej opisane metody rutynowo stosowane w laboratoriach mikrobiologicznych.

4.1. Hodowla

Właściwe pobranie i transport próbek materiałów klinicznych są konieczne do przeprowadzenia poprawnej diagnostyki laboratoryjnej [22, 23]. Materiał powinien być pobrany w sposób minimalizujący możliwość zanieczyszczenia próbek drobnoustrojami fizjologicznie zasiedlającymi skórę i błony śluzowe oraz transportowany w podłożach zapewniających warunki beztlenowe. Materiał diagnostyczny posiewany jest na podłoże Scheadler agar z 5% krwią baranią, heminą i witaminą K (bioMerieux SA, Francja). GPAC do wzrostu potrzebują atmosfery beztlenowej, dlatego inkubację należy prowadzić w anaerostatach (N_2 85%, H_2 10%, CO_2 5%) w temperaturze 37°C od 48 godzin do 7 dni. Metoda hodowli pozwala na ocenę morfologii wyhodowanych kolonii, a następnie badanie mikroskopowe (barwienie metodą Grama). Bakterie te są Gram-dodatnimi ziarenkowcami, które układają się w łańcuszki, dwoinki, tetrady lub nieregularne skupiska. Nie wytwarzają katalazy.

4.2. Identyfikacja fenotypowa

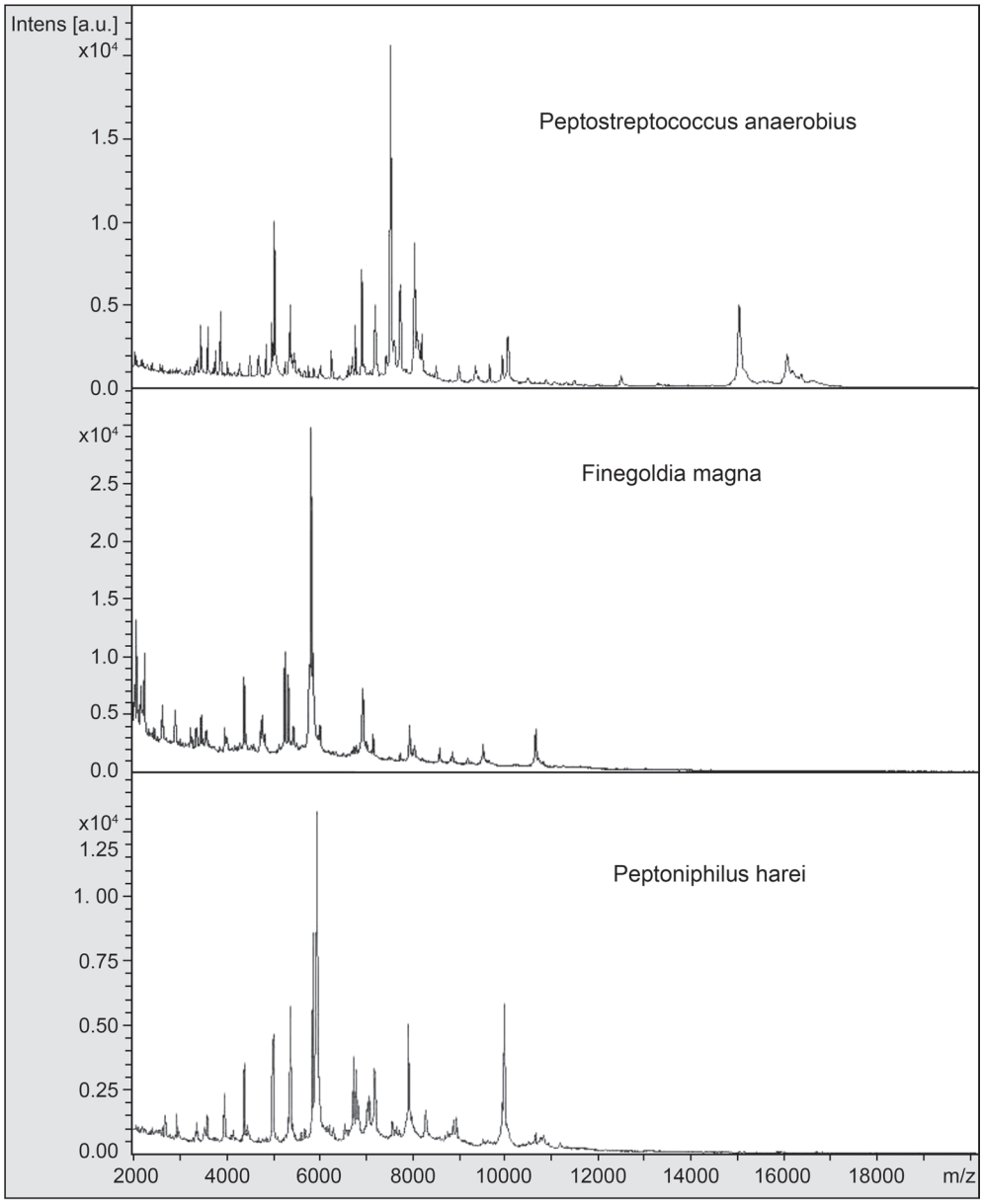
Różnicowanie i identyfikacja beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich jest utrudniona z powodu ich słabej aktywności metabolicznej. W ostatnim dziesięcioleciu fenotypowa identyfikacja bakterii beztlenowych wykonywana była przy użyciu komercyjnie dostępnych testów: RapID-ANA II (Innovative Diagnostic Systems, Atlanta, GA), Rapid ID 32A (bioMerieux SA, Francja) oraz zestawu API 20 A w automatycznym systemie ATB Expression (bioMerieux SA, Francja) [16, 28].

A P I 2 0 A. Do wykonania tego badania konieczne jest przygotowanie inokulum z czystej, świeżej hodowli w API 20A Medium do osiągnięcia zmętnienia równego lub większego 3 w skali McFarland'a. Aby uzyskać takie zmętnienie dla wolnorosnących, drobnych kolonii bakterii należy użyć więcej niż jednej płytki z hodowlą. Zawiesina z ampułki nanoszona jest na pasek API 20A i inkubowana w ciągu 24–48 godzin w warunkach beztlenowych. Test ten pozwala na ocenę metabolicznej aktywności badanego szczepu bakterii w reakcjach z umieszczonymi w mikroprobówkach liofilizowanymi substratami. Ocenie podlega zdolność do fermentacji 16 węglowodanów (D-glukoza (GLU), D-mannitol (MAN), D-laktoza (LAC), D-sacharoza (SAC), D-maltoza (MAL), salicyna (SAL), D-ksyloza (XYL), L-arabinoza (ARA), glicerol (GLY), D-celobioza (CEL), D-mannoza (MNE), D-melecytoza (MLZ), D-rafinoza (RAF), D-sorbitol (SOR), L-ramnoza (RHA), D-trehaloza (TRE); zdolność do hydrolizy żelatyny i eskuliny, wytwarzania indolu i ureazy oraz aktywność katalazy. W odczycie testu uwzględniane są również cechy morfologiczne: zdolność do wytwarzania spor, morfologia komórki oraz sposób barwienia metodą Grama. Identyfikację uzyskuje się z 8 cyfrowego profilu numerycznego, używając bazy danych z oprogramowania komputerowego Apiweb™. System API 20A służy jedynie do biochemicznej identyfikacji tych bakterii, które są włączone do bazy danych. Istnieje możliwość rozpoznawania 52 drobnoustrojów beztlenowo rosnących, identyfikacja jest więc mało precyzyjna. Dotyczy to głównie ziarenkowców, które są identyfikowane w większości przypadków, jako grupa *Peptostreptococcus* lub jako *Peptoniphilus asaccharolyticus* – jedyny gatunek GPAC istniejący w bazie danych. Opisywane bakterie na ogół nie fermentują węglowodanów. *P. asaccharolyticus* ma zdolność do generowania w warunkach *in vitro* indolu (zawarty w podłożu tryptofan za pośrednictwem tryptofanazy przekształcany jest w indol), co jest cechą wyróżniającą go w systemie API 20A. Jakość identyfikacji zależna jest od wartości procentowej identyfikacji: ≥ 99,9% – wspaniała identyfikacja, ≥ 99,0% – bardzo dobra identyfikacja, ≥ 90,0% – dobra identyfikacja, ≥ 80,0% – identyfikacja do akceptacji.

Vitek 2. Obecnie często stosowaną w laboratoriach metodą detekcji jest automatyczny system Vitek 2 (bioMerieux SA, Francja), w którym wykorzystuje się karty ANC, identyfikujące oprócz beztlenowców także maczugowce. Badanie może być wykonane w ciągu około 6 godzin, system nie wymaga generowania atmosfery beztlenowej. Podobnie jak w metodzie API 20 A, bardzo ważna jest duża gęstość zawiesiny bakteryjnej użyta do inokulacji karty ANC, około 2,7–3,3 McFarland'a. Karta zawiera 64 mikroprobówki z 36 kolorymetrycznymi testami enzymatycznymi, z których 13 opartych jest na zdolności do fermentacji, 17 prezentuje aktywność glikozydazy i arylamidazy, 2 testy to reakcje alkaliczne oraz 4 inne reakcje biochemiczne. Badania przeprowadzone przez Lee i wsp. [19] wykazały, że Vitek 2 nieprecyzyjnie identyfikuje do poziomu gatunku. W badaniu 49 gatunków GPAC, za pomocą Vitek 2 błędnie zidentyfikowano do poziomu gatunku 77,6% badanych szczepów, a 36,7% poprawnie rozpoznano jedynie do poziomu rodzaju [19]. Nieprecyzyjna identyfikacja dotyczyła *P. harei* (100%). Gatunek ten z powodu podobieństwa fenotypowego również w pracy Veloo i wsp. [36] mylnie rozpoznawano, jako *Peptoniphilus asaccharoliticus*, co prowadzi do przeszacowania częstości izolacji z próbek materiałów klinicznych [36]. Identyfikacja szczepów klinicznych może być wykonana tylko wówczas, jeśli gatunki zostały zawarte w bazie danych, która obecnie nie zawiera pełnego spektrum ważnych klinicznie drobnoustrojów [19].

MALDI-TOF MS. Obecnie istnieje możliwość identyfikowania drobnoustrojów za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry), z systemem MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Niemcy). W odróżnieniu od wyżej wspomnianych metod do badania używa się jednej kolonii (10^5 CFU) wyhodowanego szczepu, która nanoszona jest na 96-dołkową metalową płytkę (Bruker Daltonics, Niemcy). Należy przygotować 1 µl roztworu matrix [HCCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA, Bruker Daltonics, Niemcy) i 250 µl *stock solution*. 1 ml *stock solution* zawiera: 475 µl wody dejonizowanej, 25 µl 100% kwasu trifluorooctowego [TFA] i 500 µl acetonitrilu [ACN]. Roztwór matrix nanoszony jest na kolonię. Po wysuszeniu próbkę wprowadza się do komory pomiarowej aparatu i usuwa powietrze. Po uzyskaniu próżni wykonuje się właściwy pomiar. MALDI-TOF MS wykorzystuje laser gazowy N_2 pracujący impulsowo w zakresie nadfioletu ($\lambda = 337$ nm). Analiza oparta jest na jonizacji laserowej białek rybosomalnych. Pod wpływem promieni lasera białka bakteryjne ulegają desorpcji i jonizacji. Zjonizowane peptydy przyspieszane są w silnym polu elektrycznym, następnie ulegają rozdziałowi według masy cząsteczkowej, ładunku oraz odmiennego czasu przelotu. Generowane jest widmo pików, które odpowiadają jonom o różnym stosunku masy do ładunku. Na Rys. 1 przedstawiono widma wybranych GPAC. Zasada działania tej metody polega na automatycznym porównaniu otrzymanego widma z widmami referencyjnymi drobnoustrojów zapisanymi w bazie danych. Zgodnie z zaleceniami producenta wartość wskaźnika w zakresie 2,300–3,000 wskazuje na wiarygodną identyfikację do poziomu gatunku. Zakres 2,000–2,299 wiarygodnie identyfikuje drobnoustrój do poziomu rodzaju oraz wykazuje prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku; 1,700–1,999 wskazuje na prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu rodzaju, natomiast wartość poniżej 1,699 oceniana jest jako wynik niewiarygodny. Metoda ta umożliwia przeprowadzenie wiarygodnej identyfikacji w ciągu kilku minut dla pojedynczej próbki badanej lub w ciągu około 1,5 godziny dla płytki z 96 próbkami [16, 35]. W Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM przeprowadzono porównanie metod identyfikacji GPAC metodą Api 20A i MALDI-TOF MS (tabela I) [16]. Zidentyfikowano 15 gatunków ziarenkowców Gram-dodatnich i przy tak małej puli szczepów badanych, dzięki spektrometrii masowej, wykryto trzy gatunki *Finegoldia magna*. Jak wiadomo z piśmiennictwa, drobnoustrój ten jest szczególnie istotny w chorobach infekcyjnych [3, 22, 26].

Chromatografia gazowo-cieczowa (GLC). Analiza metodą chromatografii gazowej (GLC) została po raz pierwszy zastosowana w latach 70-tych do celów taksonomicznych. Następnie adoptowano ją i przez wiele lat stosowano jako metodę identyfikacji bakterii beztlenowych w laboratoriach na całym świecie. Analiza umożliwiała detekcję kwasów tłuszczowych np.: kwasu octowego, propionowego, masłowego, izomasłowego, walerianowego, izowalerianowego, izokapronowego oraz alkoholi wytwarzanych przez bakterie beztlenowe w hodowli na podłożach sztucznych oraz w hodowli krwi. Metoda ta umożliwiała klasyfikację Gram-dodatnich beztlenowców do grup: octanowej, masłowej, kapronowej. W grupie octowej znalazły się gatunki wytwarzające kwas octowy oraz nie wytwarzające lotnych kwasów tłuszczowych (VFA), do grupy masłowej natomiast zaliczono gatunki oraz nierozpoznane grupy GPAC wytwarzające kwas masłowy, natomiast do grupy kapronowej – gatunki, które produkują duże ilości długołańcuchowych lotnych kwasów tłuszczowych [22, 27]. W badaniu Murdoch i wsp. [23] analizowano 256 klinicznych szczepów GPAC i sklasyfikowano je do 5 grup na podstawie produkcji kwasów tłuszczowych. Wykazano, że blisko 44% szczepów zaliczono go grupy VFA-ujemnych, tj. nie wytwarzających kwasów tłuszczowych w ilości umożliwiających detekcję [23]. Metoda ta dość kosztowna i czasochłonna okazała się



Rys. 1. Widma uzyskane przez bezpośrednią analizę poszczególnych GPAC metodą MALDI-TOF MS w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, WUM

nieprecyzyjna w rozpoznawaniu części bakterii beztlenowych, zwłaszcza GPAC.

4.3. Identyfikacja genotypowa

Technikę wykrywania sekwencji kwasów nukleinowych wprowadzono w latach 80-tych. Umożliwiła ona dokładniejszą klasyfikację drobnoustrojów. Oprócz przydatności taksonomicznej zyskała także znaczenie w laboratoriach klinicznych. Powszechnie stosowana jest łańcuchowa reakcja polimerazy PCR i jej modyfikacje (muliplex PCR, hybrydyzacja, hybrydyzacja *in situ* FISH), które skracają czas oczekiwania na wiarygodny wynik i redukują koszty analizy [29]. Niewątpliwie „złotym standardem" w identyfikowaniu gatunków GPAC jest obecnie metoda oparta na podobieństwie w sekwencji genu kodującego 16S rRNA. Gen występuje u wszystkich bakterii i jest wysoce konserwatywny. W genie tym występują gatunkowo zmienne regiony, co warunkuje różnicę pomiędzy rodzajami i gatunkami drobnoustrojów. Metoda 16S rRNA pozwala na badanie różnorodności drobnoustrojów. Umożliwia dokonanie właściwej identyfikacji ale także szybkie rozpoznanie i klasyfikację wcześniej nieopisanych drobnoustrojów. Bazy danych zawierające sekwencję genu 16S rRNA są ogólnodostępne: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Ribosomal Database Project (RDP) lub European Molecular Biology Laboratory (EMBL), co umożliwia porównanie uzyskanych sekwencji ze szczepami referencyjnymi za pomocą oprogramowania ARB [28, 35, 38].

Tabela I

Porównanie metod identyfikacji Gram-dodatnich ziarenkowców beztlenowych: MALDI-TOF MS i Api 20A [16]

Rodzaj próbki	Identyfikacja				
	MALDI-TOF MS		Api20A		
	gatunek	wskaźnik	gatunek/grupa	profil numeryczny	%
Wymaz ze skóry prącia	*F. magna*	2,163	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	*F. magna*	2,226	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z rany	*F. magna*	1,863	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Błona maziowa	*P. harei*	1,953	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Fragment tkanki kostnej	*P. harei*	1,903	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Zeskrobiny z j.szpikowej	*P. harei*	2,106	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z przetoki	*P. harei*	2,104	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z kanału szyjki macicy	*P. harei*	1,985	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z rany	*P. harei*	1,937	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z rany	*P. harei*	2,044	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
fragment tkanki kostnej	*P. harei*	2,106	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z rany	*P. anaerobius*	2,148	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z rany	*P. anaerobius*	1,899	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	*P. anaerobius*	1,834	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	*P. anaerobius*	2,227	grupa *Peptostreptococcus*	00000006	89,6

5. Podsumowanie

Gram-dodatnie ziarenkowce kolonizują skórę i błony śluzowe. W piśmiennictwie coraz częściej prezentowane są doniesienia podkreślające udział GPAC w zakażeniach. Jednocześnie wzrasta częstość izolacji tych bakterii z materiałów klinicznych. Do najważniejszych GPAC, izolowanych z próbek materiałów klinicznych, należą rodzaje: *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus*.

F. magna wydaje się być najbardziej zjadliwym gatunkiem. Posiada czynniki chorobotwórczości podobne do tych wytwarzanych przez chorobotwórcze, tlenowo rosnące gronkowce i paciorkowce. Istnieje więc potrzeba precyzyjnej identyfikacji izolowanych szczepów oraz poznanie ich czynników wirulencji. Na szczególną uwagę zasługuje możliwość identyfikacji drobnoustrojów do poziomu gatunku za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS w laboratoriach mikrobiologicznych. Metody genotypowe, w tym sekwencjonowanie genów są szczególnie przydatne do charakterystyki nowych gatunków. Wydzielenie nowych taksonów GPAC oparte jest na wykazaniu różnic w sekwencjach genomu. Stosując metodę 16S rRNA uporządkowano dotychczasową systematykę, wykluczając niepotrzebne powtórzenia, gdyż niektóre gatunki opisane były pod różnymi nazwami i należały do odrębnych taksonów.

Obecnie coraz szerzej dostępne stają się metody sekwencjonowania „nowej generacji", które umożliwiają w krótkim czasie sekwencjonowanie całego genomu bakterii, w przyszłości być może z powodzeniem zastąpią inne metody molekularne. Niestety nawet najdoskonalsze techniki molekularne nie są w stanie uchronić nas przed błędami, które mogą pojawić się na każdym etapie badania, począwszy od pobrania materiału. Unikanie błędów w trakcie wykonywania badania, ścisłe przestrzeganie procedur oraz właściwa interpretacja wyniku wydają się stanowić klucz do sukcesu w diagnostyce zakażeń, nie tylko beztlenowcami.

Piśmiennictwo

1. Björck L.: Protein L, a novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig chains. *J. Immunol.* **140**, 1194–1197 (1988)
2. Boyanova L., Djambazov V., Gergova G., Iotov D., Petrov D., Osmanliev D., Minchev Z., Mitov I.: Anaerobic microbiology in 198 cases of pleural empyema: a Bulgarian study. *Anaerobe*, **10**, 261–267 (2004)
3. Brazier J.S., Hall V., Morris T.E., Gal M., Duerden B.I.: Antibiotic susceptibilities of Gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 224–228 (2003)
4. de Château M., Björck L.: Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first comtemporary example of module shuffling. *J. Biol. Chem.* **269**, 12147–12151 (1994)
5. de Château M., Holst E., Björck L.: Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J. Biol. Chem.* **271**, 26609–26615 (1996)
6. Donelli G., Vuotto C., Cardines R., Mastrantonio P.: Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 318–325 (2012)
7. Ezaki T., Li N., Hashimoto Y., Miura H., Yamamoto H.: 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal *Ruminococcus hansenii* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 130–136 (1994)

8. Ezaki T., Kawamura Y., Li N., Li Z.Y., Zhao L., Shu S.: Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Galicolla* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1521–1528 (2001)
9. Ezaki T., Yamamoto N., Ninomiya K., Suzuki S., Yabuuchi E.: Transfer of *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus prevotii*, and *Peptococcus magnus* to the genus *Peptostreptococcus* and proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 683–698 (1983)
10. Fournier P.E, La M.V., Casalta J.P., Richet H., Collart F., Raoult D.: *Finegoldia magna*, an early post-operative cause of infectious endocarditis: report of two cases and review of the literature. *Anaerobe*, **14**, 310–312 (2008)
11. Frick I.M., Karlsson C., Mörgelin M., Olin A.I., Janjusevic R., Hammarström C., Holst E., de Château M., Björck L.: Identification of a novel protein promoting the colonization and survival of *Finegoldia magna*, a bacterial commensal and opportunistic pathogen. *Mol. Microbiol.* **70**, 695–708 (2008)
12. Graille M., Stura E.A., Housden N.G., Beckingham J.A., Bottomley S.P, Beale D., Taussig M.J., Sutton B.J., Gore M.G., Charbonnier J.B.: Complex between *Peptostreptococcus magnus* protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. *Structure*, **9**, 679–687 (2001)
13. Han A., Lazarus G.S. i wsp.: The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* **19**, 532–541 (2011)
14. Karlsson C., Eliasson M., Olin A.I., Mörgelin M., Karlsson A., Malmsten M., Egesten A., Frick I.M.: SufA of the opportunistic pathogen *Finegoldia magna* modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9, promoting bacterial survival during epithelial inflammation. *J. Biol. Chem.* **284**, 29499–29508 (2009)
15. Karlsson C., Mörgelin M., Collin M., Lood R., Andersson M., Schmidtchen A., Björck L, Frick I.M.: SufA – a bacterial enzyme that cleaves fibrinogen and blocks fibrin network formation. *Microbiology*, **155**, 238–248 (2009)
16. Kierzkowska M., Majewska A., Kuthan R.T., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level. *J. Microbiol. Methods*, **92**, 209–212 (2013)
17. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk A., Ładomirska-Pestkowska K., Młynarczyk G.: Specyfika zakażeń bakteriami beztlenowymi na oddziałach chirurgicznych i ortopedycznych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **64**, 29–34 (2012)
18. Krepel C.J., Gohr C.M., Edmiston C.E., Farmer S.G.: Anaerobic pathogenesis: collagenase production by *Peptostreptococcus magnus* and its relationship to site of infection. *J. Infect. Dis.* **163**, 1148–1150 (1991)
19. Lee E.H., Degener J.E., Welling G.W., Veloo A.C.M.: Evaluation of Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1745–1749 (2011)
20. Liu C., Finegold S.M., Song Y., Lawson P.A.: Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb., nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1896–1902 (2008)
21. Mikamo H., Yokoyama T. i wsp.: Chapter 1–1. Anaerobic infections (General): epidemiology of anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **17**, Suppl. 1, 4–12 (2011)
22. Murdoch D.A.: Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 81–120 (1998)
23. Murdoch .A., Mitchelmore I.J.: The laboratory identification of gram-positive anaerobic cocci. *J. Med. Microbiol.* **34**, 295–308 (1991)
24. Murdoch D.A., Shah H.N.: Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe*, **5**, 555–559 (1999)
25. Murphy E.C., Frick I.M.: Gram-positive anaerobic cocci – commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* doi: 10.1111/1574-6976.12005, 1–34 (2012)
26. Rosenthal M.E., Rojtman A.D, Frank E.: *Finegoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*): an overlooked etiology for toxic shock syndrome? *Med. Hypotheses*, **79**, 138–140 (2012)
27. Sondag J.E., Ali M., Murray P.R.: Rapid presumptive identification of anaerobes in blood cultures by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 274–277 (1980)
28. Song Y., Liu C., McTeague M., Finegold S.M.: 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.* **41**,1363–1369 (2003)
29. Song Y., Liu C., McTeague M., Vu A., Liu J.Y., Finegold S.M.: Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus Peptostreptococcus by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers. *Microbiology*, **149**, 1719–1727 (2003)
30. Stephens P., Wall I.B., Wilson M.J., Hill K.E., Davies C.E., Hill C.M., Harding K.G., Thomas D.W.: Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. *Br. J. Dermatol.* **148**, 456–466 (2003)
31. Tindall B.J., Euzéby J.P.: Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatrionicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2711–2713 (2006)
32. Ueki A., Abe K., Suzuki D., Kaku N., Watanabe K., Ueki K.: *Anaerosphaera aminiphila* gen. nov., sp. nov., a glutamate--degrading, Gram-positive anaerobic coccus isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 3161–3167 (2009)
33. Ulger-Toprak N., Liu C., Summanen P.H., Finegold S.M.: *Murdochiella asaccharolytica* gen. nov., sp. nov., a Gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1013–1016 (2010)
34. Veillon A.: Sur un micrococcque anaérobie trouvé dans des suppurations fétide. *CR Soc. Seances Soc. Biol. Fil.* **45**, 807–809 (1893)
35. Veloo A.C.M., Erhard M., Welker M., Welling G.W., Degener J.E.: Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 58–62 (2011)
36. Veloo A.C.M., Welling G.W., Degener J.E.: Mistaken identity of *Peptoniphilus asaccharolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1189 (2011)
37. Wall I.B., Davies C.E., Hill K.E., Wilson M.J., Stephens P., Harding K.G., Thomas D.W.: Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *Wound Repair Regen.* **10**, 346–353 (2002)
38. Wildeboer-Veloo A.C.M., Harmsen H.J.M., Welling G.W., Degener J.E.: Development of 16S rRNA-based probes for the identification of Gram-positive anaerobic cocci isolated from human clinical specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 985–992 (2007)
39. Żabicka D., Literacka E.: Nowoczesne metody wykrywania i identyfikacji bakterii. *Forum Zakażeń*, **4**, 65–72 (2013)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 43–48
http://www.pm.microbiology.pl

UKIERUNKOWANA EWOLUCJA ENZYMÓW POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO

Katarzyna Hupert-Kocurek, Agnieszka Banaś, Danuta Wojcieszyńska, Urszula Guzik*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, Katowice

Wpłynęło w maju 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Udoskonalanie enzymów metodami nierekombinacyjnymi. 3. Udoskonalanie enzymów metodami rekombinacyjnymi. 4. Podsumowanie

Directed evolution of microbial enzymes

Abstract: Enzymes of microbial origin are extensively used in different industrial processes. However, very often these biocatalysts do not meet the requirements for a large-scale application and its properties have to be optimized. This includes not only the chemoselectivity, regioselectivity and stereoselectivity, but also long-term stability of the biocatalyst at certain temperatures or pH-values and activity in the presence of high substrate concentrations. Protein engineering has emerged as an important tool to overcome the limitations of natural enzymes as biocatalysts. There are two general strategies for protein engineering, rational design and directed evolution. In rational design detailed knowledge of the structure and function of the protein is used to make desired changes. Directed evolution involves either a random mutagenesis of the gene encoding the enzyme (e.g. by error-prone PCR) or recombination of gene fragments derived from DNase degradation, random priming recombination, random chimeragenesis on transient templates or recombined extension on truncated templates. In this review the essential methods for directed evolution of enzymes are described and various examples for the application of these protein engineering tools are provided.

1. Introduction. 2. Improvement of enzymes using non-recombinant methods. 3. Improvement of enzymes using gene-recombination methods. 4. Summary

Słowa kluczowe: mutageneza, rekombinacja, tasowanie genów
Key words: mutagenesis, recombination, DNA shuffling

1. Wprowadzenie

Enzymy pochodzenia mikrobiologicznego są powszechnie stosowane w wielu gałęziach przemysłu. Dzięki znacznemu postępowi w dziedzinie inżynierii białek możliwe stało się ich udoskonalanie w warunkach *in vitro,* prowadzące do otrzymania biokatalizatorów o zwiększonej aktywności, stabilności i określonej specyficzności. Modyfikacje właściwości enzymów polegają na wprowadzeniu określonych zmian w ich strukturze pierwszorzędowej, na drodze zmiany sekwencji nukleotydów w genie. Do najczęściej stosowanych metod umożliwiających wprowadzenie tego rodzaju zmian należą racjonalne projektowanie i ukierunkowana ewolucja [12, 19].

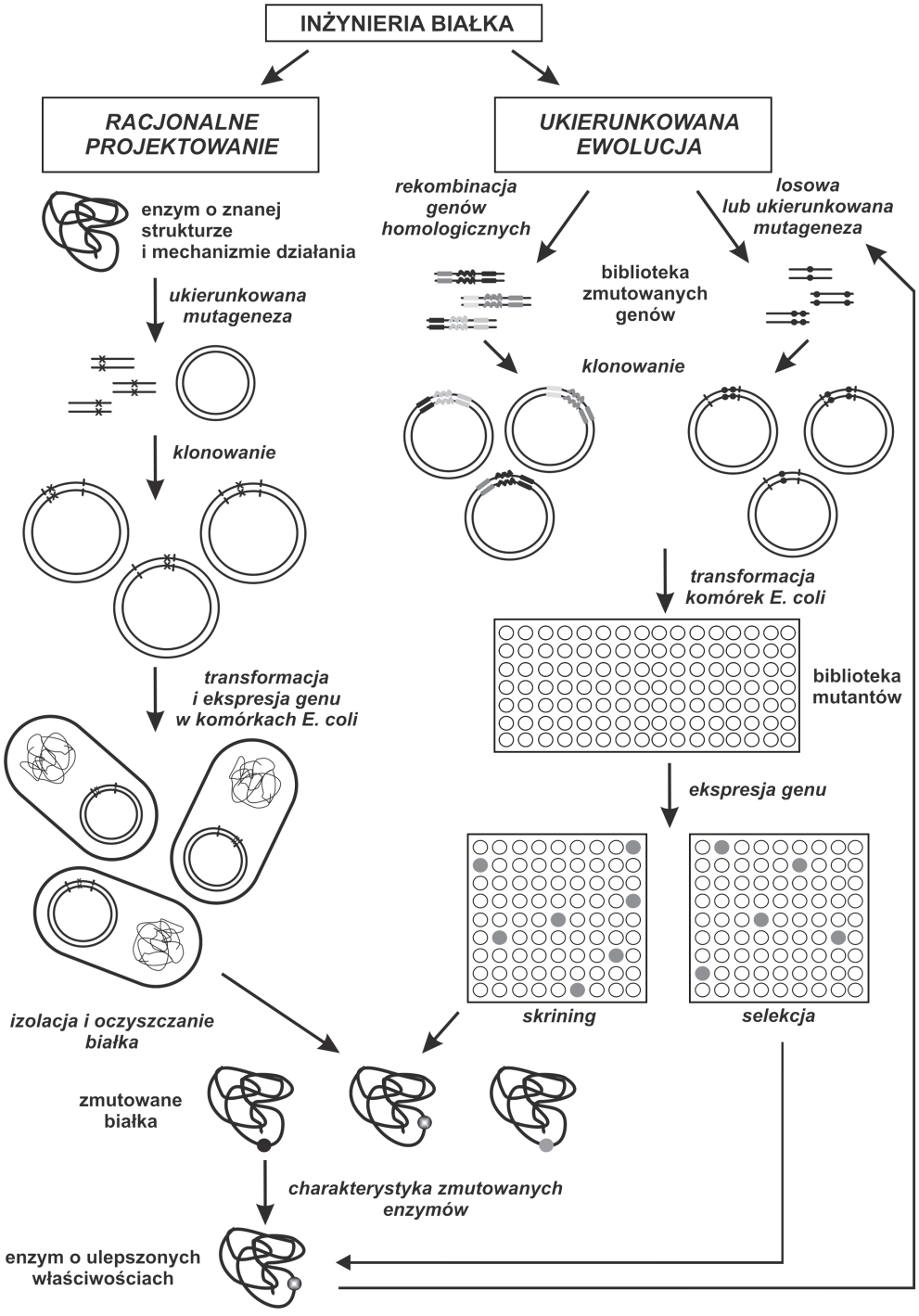
Racjonalne projektowanie polega na wprowadzeniu mutacji w określonym miejscu genu kodującego dany enzym, co prowadzi do zamiany ściśle określonych reszt aminokwasowych w obrębie miejsca aktywnego tego enzymu. W wyniku tak przeprowadzonej mutagenezy uzyskuje się enzym o nowych, pożądanych właściwościach [4, 5, 16, 19]. Alternatywą dla racjonalnego projektowania stała się, w ciągu ostatnich kilku lat, ukierunkowana ewolucja. Metoda ta naśladuje naturalny proces ewolucji zachodzący w przyrodzie [6, 7]. Mutacje mogą być wprowadzane w konkretnych miejscach przy użyciu ukierunkowanej mutagenezy, bądź w obrębie całego genu poprzez losową mutagenezę [8, 18, 23]. Po przeprowadzonej mutagenezie, zmodyfikowane geny wprowadza się do komórek gospodarza dla uzyskania ekspresji różnych wariantów genu. Pozwala to na stworzenie biblioteki wariantów, którą należy przeszukać w celu identyfikacji mutantów kodujących enzymy o ulepszonych właściwościach [4, 7]. Następnie geny kodujące udoskonalone enzymy są wykorzystywane w kolejnej rundzie ukierunkowanej ewolucji, co może prowadzić do akumulacji pożądanych cech w jednym organizmie gospodarza (Rys. 1).

2. Udoskonalanie enzymów metodami nierekombinacyjnymi

Metody nierekombinacyjne polegają na wprowadzaniu w obrębie genu mutacji punktowych, które prowadzą do substytucji pojedynczych aminokwasów, insercji lub delecji więcej niż jednego aminokwasu, jak również losowej mutagenezy wzdłuż całego genu [19].

Najbardziej popularną nierekombinacyjną metodą wprowadzania różnorodności genetycznej jest podatna

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 454, email: urszula.guzik@us.edu.pl



Rys. 1. Porównanie metod stosowanych w inżynierii białek, umożliwiających uzyskanie enzymów o ulepszonych właściwościach

na błędy łańcuchowa reakcja polimerazy (error-prone Polimerase Chain Reaction; epPCR). Metoda ta polega na wprowadzeniu mutacji punktowych podczas reakcji PCR z użyciem termostabilnej polimerazy *Taq*, która w warunkach *in vitro* nie ma zdolności naprawy swoich błędów [8, 11, 19, 23]. Dokładność tej polimerazy można dodatkowo zmniejszyć poprzez zwiększenie stężenia jonów magnezu Mg^{2+} lub użycie nierównych stężeń nukleotydów dNTP. Wadą epPCR jest generowanie często takich samych mutacji w obrębie genu lub mutacji milczących, które ze względu na degenerację kodu genetycznego nie powodują zmiany aminokwasu [11, 19].

Technika epPCR została zastosowana przez L i u i wsp. [15] w celu poprawy aktywności enzymatycznej bakteryjnej lakazy Lac591 uczestniczącej w dekoloryzacji barwników tekstylnych. Lakazy bakteryjne, w odróżnieniu od grzybowych, charakteryzują się wysoką aktywnością i stabilnością w wysokich wartościach pH oraz katalizują reakcje bezpośredniego utlenienia substratów, w tym barwników, o różnym potencjale redoks bez

obecności mediatorów – niskocząsteczkowych związków pośredniczących w przekazywaniu elektronów z substratu do centrum aktywnego enzymu. W wyniku trzech rund losowej mutagenezy otrzymano mutanta Lac3T93, z czterema substytucjami aminokwasów (N40S, V55A, F62L, E316V), który charakteryzował się 4,8-krotnie wyższą aktywnością względem 2,6-dimetoksyfenolu (2,6-DMP) niż enzym dzikiego typu. Wprowadzone mutacje spowodowały również przesunięcie optimum pH mutowanego enzymu z 7,5 do 8,0 oraz optimum temperatury z 55°C do 60°C.

Stosowanie lipaz w procesach przemysłowych uzależnione jest od ich specyficzności i stabilności, oraz zdolności katalizy w obecności rozpuszczalników organicznych. K h u r a n a i wsp. [13] zastosowali technikę epPCR w celu modyfikacji lipazy wyizolowanej z *Bacillus subtilis*. Lipaza pochodząca z tego szczepu bakterii wykazywała optimum aktywności w temperaturze 33 ± 4°C i w pH 8.0. Czas półtrwania ($T_{½}$) tego enzymu w temperaturze 50°C wynosił około siedem minut. W wyniku zastosowania jednej rundy epPCR uzyskano siedem mutantów, wśród których cztery wykazywały zwiększoną termostabilność. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji aminokwasowej jednego z nich wykazała, że wprowadzona mutacja spowodowała zamianę izoleucyny na treoninę w pozycji 56, w N-końcowej części łańcucha polipeptydowego. Mutacja ta nie wpłynęła na profil pH zmutowanego enzymu natomiast spowodowała przesunięcie jego optimum temperatury do 38 ± 3°C. Dodatkowo czas półtrwania tej formy enzymu w temperaturze 50°C wzrósł do 21 minut.

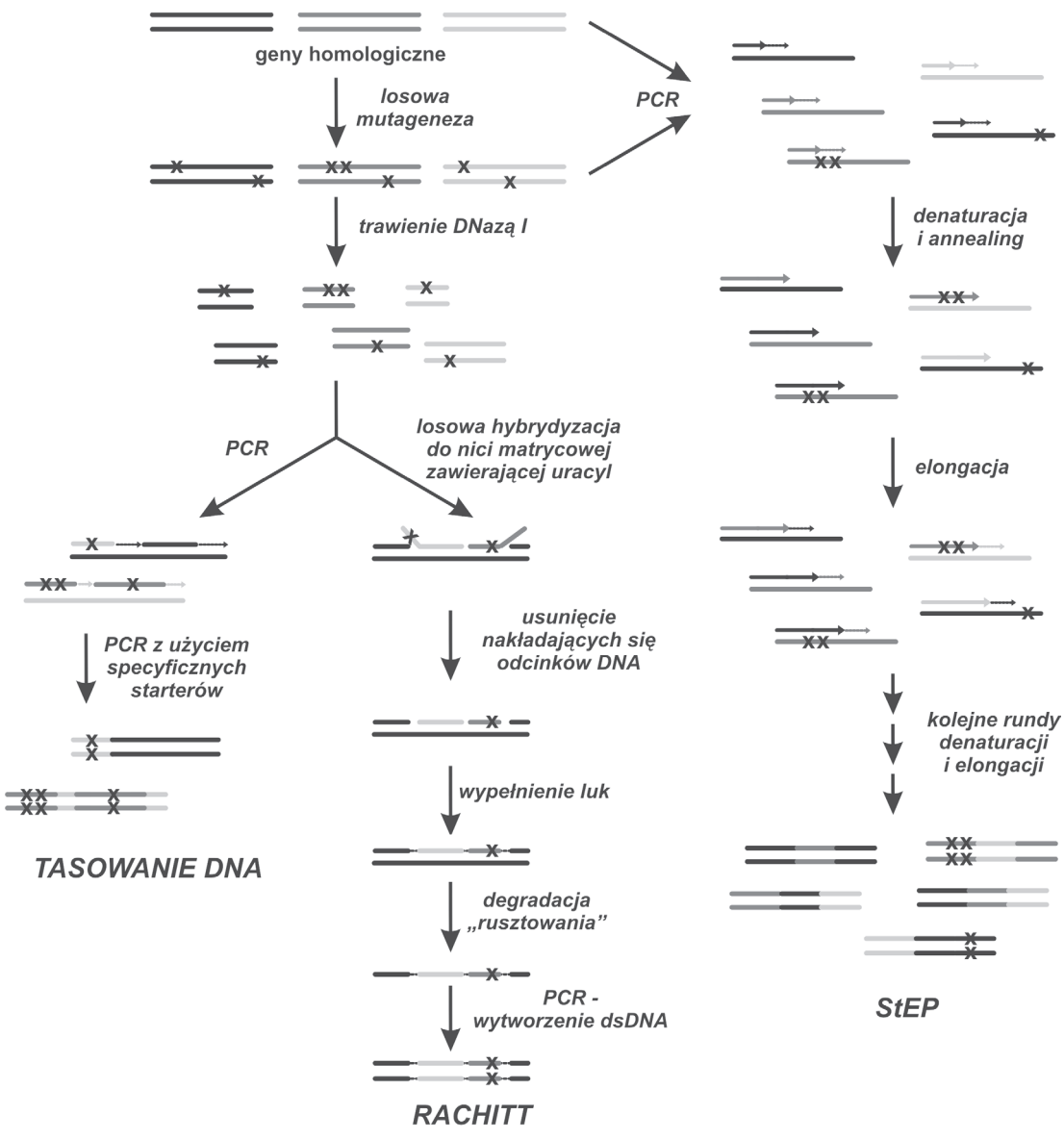
W 2009 roku N a k a z a w a i wsp. [17] zastosowali ukierunkowaną ewolucję w celu zwiększenia aktywności katalitycznej endoglukanazy III, enzymu z grupy celulaz, względem karboksymetylocelulozy. Optimum pH działania tego enzymu wynosi 4,8, podczas gdy procesy przemysłowe prowadzone są w pH neutralnym bądź zasadowym. cDNA genu *egl*3 kodującego endoglukanazę III poddano dwom rundom losowej mutagenezy. Otrzymany mutant 2R4 był aktywny w szerszym zakresie pH 4,4–8,8 niż jego forma dzika. Zmutowane białko zawierało sześć podstawień aminokwasów (G41E, T110P, K173M, Y195F, P210S, N2181), a jego aktywność względem karboksymetylocelulozy zwiększyła się 1,4-razy w porównaniu z enzymem typu dzikiego. Ponadto wzrosła jego termostabilność, dzięki czemu enzym nie tracił swojej aktywności przez 30 minut w temperaturze 55°C.

Losowa mutageneza techniką epPCR umożliwiła również zwiększenie aktywności subtylizyny E w rozpuszczalniku organicznym – dimetyloformamidzie [21]. Subtylizyna E jest proteazą serynową efektywnie działającą w alkalicznym środowisku, niewykazującą jednak aktywności w rozpuszczalnikach organicznych. Kataliza w rozpuszczalnikach organicznych daje większe zastosowania subtylizyny E w syntezach organicznych, między innymi w stereo selektywnych acylacjach racemicznych. Stąd poszukiwanie enzymów aktywnych w tym środowisku. W 1993 roku A r n o l d i wsp. [3] otrzymali mutanta z czterema substytucjami aminokwasów (D60N, D97G, Q103R, N218S). W celu zwiększenia liczby mutacji przeprowadzono trzy rundy losowej mutagenezy, w wyniku czego wygenerowano kolejne 6 mutacji (G131D, E156G, N181S, S182G, S188P i T225A). Mutant z dziesięcioma substytucjami aminokwasów hydrolizował białkowe substraty 256-razy efektywniej niż dziki typ enzymu, w 60% dimetyloformamidzie. Wszystkie mutacje wpływające na aktywność katalityczną tego mutanta w rozpuszczalniku organicznym znajdowały się w tym samym rejonie białka, w obrębie centrum aktywnego i kieszeni wiążącej substrat.

Miejscowo specyficzna mutageneza wysycenia (Site-Specyfic Saturation Mutagenesis; SSSM) umożliwia wprowadzenie wszystkich możliwych podstawień w określonej pozycji sekwencji nukleotydowej danego białka warunkujących zastąpienie konkretnego aminokwasu przez 19 pozostałych [11]. W mutagenezie wysycenia reakcję PCR przeprowadza się z uniwersalnymi starterami oraz mieszaniną dwóch mutagennych starterów, które zawierają określoną mutację i pozwalają zmodyfikować docelowy gen. W wyniku amplifikacji z użyciem obu typów starterów otrzymuje się fragmenty DNA mające komplementarne, nakładające się na siebie końce. W kolejnych cyklach reakcji PCR następuje wydłużanie otrzymanych fragmentów z użyciem uniwersalnych starterów, co umożliwia ostatecznie uzyskanie zmodyfikowanego genu o pełnej długości [11].

Ukierunkowana ewolucja umożliwiła zmianę właściwości katalitycznych dioksygenazy anilinowej izolowanej z *Acinetobacter* sp. Enzym ten kodowany jest przez pięć genów: *atdA1*, *atdA2*, *atdA3*, *atdA4* i *atdA5*. Gen *atdA3* ma wpływ na aktywność enzymu oraz jego specyficzność substratową. Mutacja w obrębie tego genu prowadząca do zamiany V205A umożliwiła wykorzystanie przez zmutowany enzym 2-izopropyloalaniny (2IPA) jako substratu, podczas gdy dziki typ enzymu nie był w stanie degradować tego związku [1]. Zwiększenie specyficzności substratowej enzymu zmniejszyło jednak jego aktywność względem aniliny i 2,4-dimetyloalaniny (2,4DMA) odpowiednio o 8,4- i 28 razy w porównaniu z dziką formą enzymu. Przeprowadzając jedną rundę SSSM i epPCR genu mutanta V205A A n g i wsp. [2] dodatkowo zwiększyli aktywność dioksygenazy anilinowej względem aniliny, 2,4DMA i 2IPA oraz poszerzyli jej specyficzność substratową w stosunku do 2-sekbutyloaniliny. W sekwencji uzyskanego mutanta 3-R21 zlokalizowano trzy mutacje: V205A, I248L i S404C.

W a n g i wsp. [22] podjęli próby zmiany optimum pH z kwasowego na neutralne endoglukanazy III z *Trichoderma reesei*. Otrzymany w wyniku epPCR mutant N321T z substytucją nukleotydów powodującą zamianę asparaginy na treoninę wykazywał optymalną aktywność przy pH 5,4. Po przeprowadzeniu „mutagenezy



Rys. 2. Etapy uzyskiwania zrekombinowanych genów metodą tasowania DNA, RACHITT i StEP. Opis w tekście

wysycenia" otrzymano dwa mutanty. Mutant N321D charakteryzował się optimum pH 4,0, natomiast mutant N321H wykazywał maksymalną aktywność w pH 5,5, jednak utrzymywał 84% aktywności w pH 6,0.

3. Udoskonalanie enzymów metodami rekombinacyjnymi

Rekombinacyjne metody ukierunkowanej ewolucji wprowadzające zmiany w obrębie genu polegają na rekombinacji homologicznych genów [19]. Metody te obejmują między innymi tasowanie DNA, w którym gen kodujący docelowe białko poddaje się mutagenezie, na przykład metodą epPCR, a otrzymany zestaw homologicznych genów zawierających różne mutacje punktowe trawi się za pomocą DNazy I. Uzyskane fragmenty genów o dużej homologii pełnią rolę starterów dla reakcji PCR, w wyniku czego uzyskuje się gen o pełnej długości. Ze względu na homologię uzyskanych fragmentów, podczas reakcji ich składania może dochodzić do rekombinacji między nimi. Ponieważ liczba tak zrekonstruowanych sekwencji jest niewielka, w drugim etapie tasowania DNA przeprowadza się reakcję PCR z użyciem starterów specyficznych dla rekombinowanego genu, co pozwala na zwiększenie ilości złożonych sekwencji (Rys. 2) [7, 11, 19]. Stosowanie tej metody jest wydajne tylko dla regionów o wysokiej homologii sekwencji, gdyż geny o niskiej homologii dają niewielką liczbę zrekombinowanych wariantów [11].

C a n a d a i wsp. [5] zastosowali tasowanie DNA w celu zwiększenia specyficzności substratowej *orto*-monooksygenazy toluenowej (TOM) względem chlorowanych związków alifatycznych i naftalenu. Monooksygenaza ta, wyizolowana z *Burkholderia cepacia* G4 składa się z trzech komponentów białkowych, na które

składają się hydroksylaza, oksydoredukraza oraz białko przenoszące elektrony pomiędzy hydroksylazą i oksydoreduktazą. Enzym ten katalizuje utlenianie toluenu, trichloroetylenu (TCE) oraz chlorku winylu, jak również utlenianie naftalenu do naftolu, ważnego intermediatu w syntezie herbicydów, insektycydów, leków oraz barwników. Monooksygenaza TOM wykorzystywana jest również często w bioremediacji ze względu na zdolność do utleniania trichloroetylenu, który jest najczęstszym związkiem zanieczyszczającym wody gruntowe. Otrzymany mutant TOM-green, wykazywał dwukrotnie wyższą aktywność względem trichloroetylenu (TCE) w porównaniu z dzikim typem enzymu. Hydroksylacja 0,1 mM naftalenu z udziałem zmutowanego enzymu następowała 6-krotnie szybciej niż z udziałem formy dzikiej. Ponadto enzym ten wykazywał aktywność dla wyższych stężeń substratu.

Zastosowanie ukierunkowanej ewolucji obejmującej epPCR, a następnie trzy rundy tasowania DNA, przeprowadzone przez F a n g i wsp. [9] umożliwiły poprawę aktywności alkalicznej lipazy pochodzącej z *Proteus vulgaris* (PVL). Uzyskany mutant, u którego stwierdzono trzy substytucje aminokwasowe (V102I, G197S i ZR229H) wykazywał aktywność 5,8-razy wyższą w porównaniu z aktywnością białka dzikiego typu. Badając strukturę przestrzenną zmutowanej formy enzymu wykazano, że za wzrost aktywności odpowiada zmiana aminokwasu w pozycji 102.

Synteza rekombinowanego genu poprzez losowe przyłączanie starterów do matrycy DNA (Random Priming Recombination; RPR) jest metodą opartą na reakcji PCR. W metodzie tej w wyniku losowego przyłączania startera do matrycy uzyskuje się mieszaninę krótkich fragmentów DNA, które ze względu na występowanie sekwencji homologicznych, rekombinują tworząc gen o pełnej długości [19, 23]. RPR zastosowano w celu zwiększenia specyficzności substratowej dioksygenazy bifenylowej szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. W wyniku dwóch rund rekombinacji wyselekcjonowano mutanta o aktywności względem nie tylko bifenyli, ale także ich chlorowych pochodnych, dibenzofuranu, dibenzo-*para*-dioksyn, dibenzotiofenu oraz fluorenu. Wykazano, że za zmiany w specyficzności substratowej enzymu odpowiadała substytucja aminokwasu w pozycji 376 [20].

Synteza chimerycznego genu na tymczasowej matrycy DNA (Random Chimeragenesis on Transient Templates; RACHITT) pozwala na uzyskanie zrekombinowanego genu w wyniku losowej hybrydyzacji jednoniciowych fragmentów homologicznych genów z matrycą DNA. Matrycą jest zmodyfikowana nić DNA, niosąca gen homologiczny pochodzący z innego gatunku, zawierająca uracyl. Pierwszy etap rekombinacji obejmuje fragmentację pojedynczej nici DNA z udziałem DNazy I. Następnie uzyskane jednoniciowe fragmenty DNA hybrydyzują z komplementarną matrycową nicią DNA. Nakładające się na siebie odcinki DNA są usuwane, a powstałe luki uzupełniane przez polimerazę DNA. W kolejnym etapie matrycowy DNA ulega degradacji. Zrekombinowana nić zostaje zamplifikowana w reakcji PCR, co prowadzi ostatecznie do uzyskania genu o pełnej długości [19]. Etapy uzyskiwania zrekombinowanego genu metodą RACHITT przedstawiono na rysunku 2. C o c o i wsp. [19] zastosowali opisana metodę w celu zwiększenia powinowactwa substratu do enzymu i poszerzenia specyficzności substratowej monooksygenazy dibenzotiofenowej, kluczowego enzymu w biodesulfurylacji paliw. W wyniku procesu rekombinacji dwóch homologicznych genów *dszC* uzyskano 175 chimer mających aktywność monooksygenazy dibenzotiofenowej, z których niektóre charakteryzowały się szerszą specyficznością substratową i większym powinowactwem do substratu (do 320%).

W przeciwieństwie do RACHITT, metoda rekombinacyjnego wydłużania DNA na skróconych matrycach (Recombined Extension on Truncated Templates; RETT) pozwala na uzyskanie fragmentów DNA bez udziału DNazy I. W metodzie tej stosuje się endonukleazę I, która rozpoznaje i trawi DNA w miejscach przylegających do nukleotydów pirymidynowych. Pozwala to na większą różnorodność uzyskanych fragmentów. W metodzie RETT matrycą dla zrekombinowanego genu są jednoniciowe, syntetyzowane w jednym kierunku fragmenty DNA, uzyskane w wyniku przeprowadzonej *in vitro* reakcji odwrotnej transkrypcji. Dzięki mutacjom wprowadzonym przez odwrotną transkryptazę podczas syntezy tych ssDNA uzyskuje się większą różnorodność genetyczną fragmentów. Po zsyntetyzowaniu przez odwrotną transkryptazę puli jednoniciowych fragmentów DNA, miesza się je z primerami rozpoznającymi fragmenty zawierające koniec 3' docelowego genu i przeprowadza pierwszą rundę reakcji PCR. Wydłużany ze specyficznego primera fragment DNA, w kolejnej reakcji PCR, przyłącza się do kolejnego ssDNA na zasadzie komplementarności, co prowadzi do dalszego wydłużania nici. Reakcje te powtarzane są aż do uzyskania pełnej długości nici kodującej gen docelowy [14].

L e e i wsp. [14] wykorzystali metodę RETT w celu poprawienia termostabilności chitynazy. W badaniach poddali oni rekombinacji dwa homologiczne geny kodujące ten enzym w komórkach szczepów *Serratia marcescens* ATCC21074 i *S. liquefaciens* GM1403. W wyniku reakcji uzyskano chimeryczny gen o ponad 70% homologii z genami macierzystymi. Chimeryczna chitynaza odznaczała się 4-krotnie dłuższym czasem półrozpadu w temperaturze 60°C niż obie formy rodzicielskie.

Kolejną rekombinacyjną metodą umożliwiającą wprowadzenie zmian w obrębie danego genu jest proces naprzemiennego wydłużania DNA (Staggered Extension Process; StEP). Pozwala ona na utworzenie biblioteki chimerycznych genów, w których jeden gen powstaje w wyniku rekombinacji kilku innych genów. W wyniku

naprzemiennie powtarzających się cykli denaturacji matrycy DNA i wydłużania fragmentów DNA powstają zrekombinowane geny. Rosnące fragmenty DNA przyłączają się do innej matrycy w każdym kolejnym cyklu reakcji (Rys. 2) [11, 19].

Metoda tasowania genów z użyciem zdegenerowanych oligonukleotydów (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling; DOGS) umożliwia tasowanie genów różniących się między sobą sekwencją nukleotydową, w tym zawartością par G-C. W pierwszym etapie sekwencje homologicznych genów porównuje się w celu identyfikacji konserwatywnych fragmentów. Następnie geny dzieli się na segmenty i dla każdego segmentu projektuje zdegenerowane primery. Każdy segment zostaje zamplifikowany z udziałem mieszaniny zdegenerowanych primerów, a uzyskane fragmenty DNA są rozdzielane i izolowane z żelu. W celu uzyskania odpowiedniego poziomu rekombinacji badanego genu, uzyskane fragmenty miesza się w ściśle określonych proporcjach i używa jako matrycy w reakcji PCR z dodatkiem wspólnych primerów powodujących wydłużenie segmentów, tak aby zachodziły na siebie. Otrzymane produkty stanowią matrycę w kolejnych cyklach reakcji PCR, w których powstaje gen o pełnej długości. Gen oflankowany jest sekwencjami rozpoznawanymi przez wybrane enzymy restrykcyjne. Amplifikacja zrekombinowanego genu z udziałem primerów z wbudowanymi sekwencjami dla enzymów restrykcyjnych pozwala na wklonowanie uzyskanych rekombinantów do wektora, ich ekspresję i screening w kierunku posiadanej cechy [10].

4. Podsumowanie

Stosowanie enzymów w procesach przemysłowych jest ważnym aspektem nowoczesnej biotechnologii ze względu na korzystne właściwości biokatalizatorów. Najważniejsze z nich to wysoka selektywność i specyficzność umożliwiająca syntezę różnych związków, w tym pojedynczych enancjomerów. Kolejnym aspektem przemawiającym za stosowaniem enzymów są łagodne warunki procesu, które nie mają negatywnego wpływu na środowisko. Jednak dostępność odpowiednich enzymów do konkretnych procesów przemysłowych jest ograniczona, dodatkowo warunki ich prowadzenia często są skrajne, w których enzymy tracą stabilność i aktywność. Ukierunkowana ewolucja jest kluczową metodą pozwalającą na tworzenie enzymów o ulepszonych właściwościach lub zupełnie nowych, mających duże znaczenie dla przemysłu.

Piśmiennictwo

1. Ang E.L., Obbard J.P., Zhao H.M.: Probing the molecular determinants of aniline dioxygenase substrate specificity by saturation mutagenesis. *FEBS J.* **274**, 928–939 (2007)
2. Ang L.E., Obbard P.J., Zhao H.: Directed evolution of aniline dioxygenase for enhanced bioremediation of aromatic amines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 1063–1070 (2009)
3. Arnold F.H., Georgious G.: Directed evolution library creations: methods and protocols. Humana Press Inc, New Jersey, 2003
4. Bornscheuer T.U., Pohl M.: Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 137–143 (2001)
5. Canada K.A, Iwashita S., Shim H., Wood T.K.: Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.* **184**, 344 (2002)
6. Dalby A.P.: Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 500–505 (2003)
7. Dalby P.A.: Engineering enyzmes for biocatalysis. *Recent Pat. Biotechnol.* **1**, 1–9 (2007)
8. Dably A.P.: Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 473–480 (2011)
9. Fang Y., Lu Y., Lv F., Bie X., Zhao H., Wang Y., Lu Z.: Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. *Enzyme Microb. Technol.* **44**, 84–88 (2009)
10. Gibbs M.D., Nevalainen K.M., Bergquist P.L.: Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shufling. *Gene*, **271**, 13–20 (2001)
11. Jeager K.E., Eggert T., Reetz M.T.: Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519–530 (2001)
12. Kalinowska H., Buchowiecka A., Bielecki S.: Biokataliza. *Kosmos*, **56**, 327–334 (2007)
13. Khurana J., Singh R., Kaur J.: Engineering of *Bacillus* lipase by directed evolution for enhanced thermal stability: effect of isoleucine to threonine mutation at protein surface. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 2919–2926 (2011)
14. Lee S.H, Ryu J.K, Kang M.J., Wang E.S, Piao Z., Choi Y.J, Jung K.H., Jeon J.Y.J., Shin Y.C.: A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B: Enzym*. **26**, 119–129 (2003)
15. Liu H.Y., Ye M., Lu Y., Zhang X., Li G.: Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 667–675 (2011)
16. Morley K.L., Kazlaukas R.J.: Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol*. **23**, 231–237 (2005)
17. Nakazawa H., Okada K., Onodera T., Ogasawara W., Okada H., Morikawa M.: Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 649–657 (2009)
18. Otten L.G., Quax W.J.: Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* **22**, 1–9 (2005)
19. Sen S., Venkata Dasu V., Mandal B.: Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **143**, 212–223 (2007)
20. Suenaga H., Goto M., Furukawa K.: Emergence of multifuncional oxygenase activities by random priming recombination. *J. Biol. Chem.* **276**, 22500–22506 (2001)
21. Tao H., Cornish V.W.: Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 858–864 (2002)
22. Wang T., Liu X., Yu Q., Zhang X., Qu Y., Gao P., Wang T.: Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomol. Eng.* **22**, 89–94 (2005)
23. Zhang H., Kong X., Zhang J.: New strategies of protein engineering – directed evolution of enzyme *in vitro*. *Chin. Sci. Bull.* **44**, 1641–1648 (1990)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 49–60
http://www.pm.microbiology.pl

ROLA I ZNACZENIE PROTEINAZ ZWIĄZANYCH Z POWIERZCHNIĄ KOMÓREK BAKTERII *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

Katarzyna Skrzypczak[1]*, Waldemar Gustaw[1], Adam Waśko[2]

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
[1] Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów
[2] Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości peptydaz związanych z powierzchnią komórek (CEP) bakterii *Lactobacillus helveticus.* 2.1. Budowa i charakterystyka białek CEP. 2.2. Mechanizm katalitycznego działania CEP's. 2.3. Geny kodujące białka CEP oraz mechanizmy kontrolujące ich biosyntezę. 3. Mechanizm działania systemu proteolitycznego *Lactobacillus helveticus.* 4. Znaczenie i możliwości praktycznego wykorzystania systemu proteolitycznego bakterii *Lactobacillus helveticus.* 5. Podsumowanie

The role and significance of cell – envelope associated proteinases of *Lactobacillus helveticus* bacteria

Abstract: The authors present the current state of knowledge about the proteolytic system of *Lactobacillus helveticus* and compare it with system presents in other lactic acid bacteria (LAB). The proteolytic activity of these bacteria is used in food production, where the degradation of the protein is responsile for flavor, aroma and texture. From all lactic acid bacteria *L. helveticus* have the highest proteolytic activity, which directly involved the cell envelope associated proteinases (CEPs). This also contribute to a formation of bioactive peptides referring to value of health promoting food. *L. helveticus* bacteria seem to be unique in terms of variation of the number of genes CEP proteins of all lactic acid bacteria. This paper review focuses on the genetic basis determining the properties of CEP proteins occurring in *L. helveticus* and possibilities of practical application of these bacterial strains.

1. Introduction. 2. Properties of Cell – Envelope associated Proteinases (CEPs) of *Lactobacillus helveticus.* 2.1. Structure and characterization of CEPs. 2.2. The mechanism of the catalytic activity of CEP's 2.3. Genes encoding CEPs and their biosynthesis control mechanisms. 3. The mechanism of proteolytic system in *Lactobacillus helveticus.* 4. The importance and possibilities of practical use the proteolytic system of Lactobacillus helveticus. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, *Lactobacillus helveticus,* proteinazy związane z powierzchnią komórki (CEPs)
Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus helveticus*, Cell – Envelope associated Proteinases (CEPs)

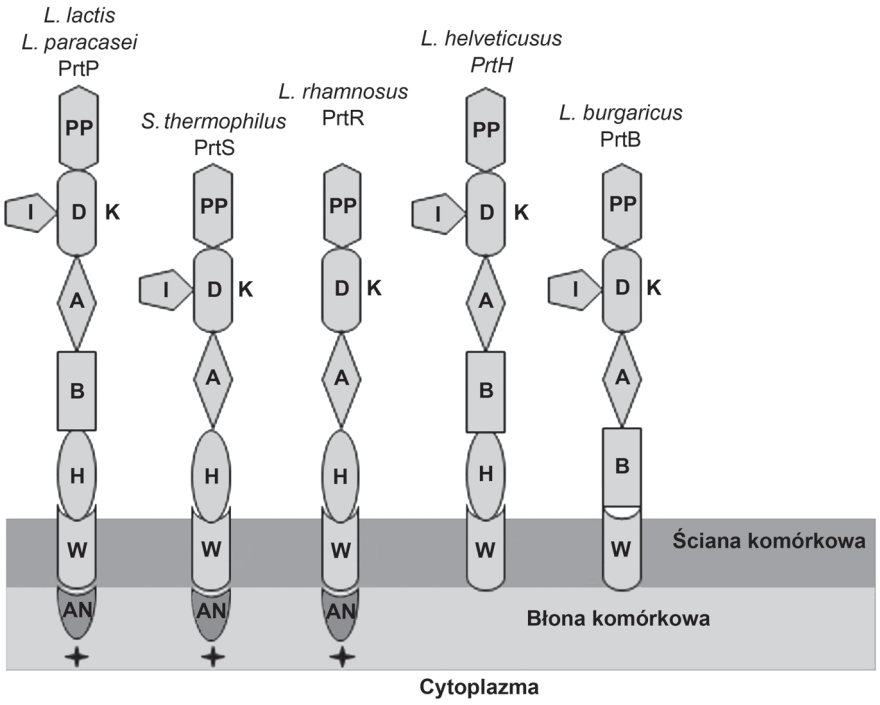
1. Wstęp

Termofilne bakterie *Lactobacillus helveticus* są Gram-dodatnimi, niesporującymi pałeczkami należącymi do bakterii kwasu mlekowego (Lactic Acid Bacteria-LAB). Te obligatoryjnie homofermentatywne mikroorganizmy są wykorzystywane w przemyśle mleczarskim jako kultury starterowe. Są organizmami auksotroficznymi pozbawionymi zdolności do syntezy większości aminokwasów niezbędnych do wzrostu. Występująca wśród bakterii kwasu mlekowego auksotroficzność dotyczy także zasad purynowych, pirymidynowych oraz witamin. *L. helveticus* do swojego wzrostu wymaga 29 różnych związków organicznych z wymienionych grup [47].

Ze względu na zbyt małą ilość wolnych aminokwasów w mleku, bakterie mlekowe wytworzyły złożony system proteolityczny zdolny do uwalniania tych związków poprzez hydrolizę kazein, albumin czy też globulin [12]. System ten składa się z trzech z podstawowych elementów, w skład których wchodzą proteinazy związane z powierzchnią komórki bakteryjnej tzw. białka CEPs (cell envelope associated proteinases). Enzymy te prowadzą hydrolizę kazein do oligopeptydów. Drugim elementem sytemu, który pozwala na przyswajanie źródła azotu jest układ transportujący powstałe di- oraz tri peptydy do wnętrza komórki. Mechanizm tego transportu u bakterii *L. helveticus* nie jest jeszcze w pełni poznany. Ostatnim komponentem układu proteolitycznego są wewnątrzkomórkowe peptydazy o zróżnicowanej specyfice substratowej, które przyczyniają się do powstawania wewnątrzkomórkowej puli wolnych aminokwasów [69] (rys. 2 i 3).

Proteinazy związane z powierzchnią komórek bakterii rozwijających się w mleku oprócz roli, jaką pełnią w pozyskiwaniu niezbędnych aminokwasów dla wzrostu samych mikroorganizmów, przyczyniają się również do kreowania zapachu, smaku oraz konsystencji mlecznych produktów fermentowanych biorąc udział w procesie proteolizy. Głównymi produktami proteolizy są aminokwasy, alkohole, estry, kwasy, aldehydy, a także związki siarkowe [78]. Ponadto produkty aktywności proteinaz wykazują działanie prozdrowotne. Wpływają na produkcję bioaktywnych peptydów o właściwościach immunomodulujących, hipotensyjnych oraz hamujących aktywność bakterii chorobotwórczych,

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin; e-mail: k8.skrzypczak@wp.pl



Rys.1. Schematyczne porównanie budowy proteinaz związanych z powierzchnią komórki u różnych bakterii LAB [73]
PP: preprodomena, DK: domena katalityczna; I: domena insercyjna; A: domena A; B: domena B; H: domena H- helisa (helix domain), W: domena W- łącznik; AN: anchor (domena zakotwiczona w błonie). Na podstawie [69] dzięki uprzejmości i za zgodą autorów [73]

zmniejszają także ryzyko wystąpienia raka okrężnicy [21, 72, 81]. Wśród wszystkich bakterii należących do LAB, *L. helveticus* generują peptydy o najwyższej aktywności przeciwnadciśnieniowej [88]. Jednakże proteinazy związane z powierzchnią komórek bakterii *L. helveticus* nie są w pełni poznane i scharakteryzowane. Niniejsza praca koncentruje się na analizie genetycznych podstaw warunkujących właściwości białek CEP występujących u *L. helveticus* oraz możliwościach praktycznego zastosowania szczepów tych bakterii.

2. Właściwości peptydaz związanych z powierzchnią komórek (CEP) bakterii *Lactobacillus helveticus*

Wszystkie zidentyfikowane u *L. helveticus* białka CEP należą do proteinaz serynowych, a ich wielkość mieści się w zakresie 170–180 kDa [66]. Poznane sekwencje aminokwasowe wykazują wysokie podobieństwo tych enzymów do białek powierzchniowych S. Optymalny dla aktywności CEP zakres temperatury mieści się w granicach 37–45°C, natomiast optymalne wartości pH to 6–7 [56]. Najwyższy poziom aktywności proteolitycznej białek CEP odnotowano w ekspotencjalnej fazie wzrostu bakterii [23] i jest ona znacznie wyższa w przypadku hodowli bakterii inkubowanych w mleku niż na pożywce MRS [77]. Ponadto, zaobserwowano, iż dodatek jonów wapnia do podłoża hodowlanego, w zależności od szczepu bakterii *L. helveticus*, może powodować wzrost lub znaczny spadek aktywności enzymatycznej [9, 56] Również miejsce cięcia kazeiny przez proteinazy należące do białek CEP jest wysoce specyficzne dla danego szczepu *L. helvetius* [58].

2.1. Budowa i charakterystyka białek CEP

Proteinazy należące do białek CEPs są zazwyczaj syntetyzowane w cytoplazmie bakterii w postaci długich i nieaktywnych form- pre-pro-proteinaz składających się z około 2000 reszt aminokwasowych tworzących kilka odrębnych domen (Rys. 1) funkcjonalnych [8].

Pre-pro-proteinazy na swym N-końcu łańcucha peptydowego posiadają domenę preproproteinową (PP) zawierającą sekwencję sygnałową (S) zbudowaną z 40 aminokwasów, która jest niezbędna do translokacji białka przez błonę cytoplazmatyczną przy udziale białek grupy Sec. Sekwencja ta rozpoznawana jest przez specyficzne peptydazy związane z błoną komórkową. Efektem enzymatycznej hydrolizy wiązania pomiędzy Ala_{25} i Glu_{26} jest powstanie nieaktywnej formy pro-proteinazy PrtH, która ulega dalszym modyfikacjom. Prodomena (PP), pełni rolę białka opiekuńczego (chaperonu) i odgrywa istotną rolę w procesie właściwego fałdowania się białka CEP. Domena ta również podlega procesowi autokatalizy, a miejsce przecięcia wiązania znajduje się między Glu_{176} i Ala_{177} w przypadku PrtH, oraz pomiędzy Ala_{184} i Asn_{185} dla PrtH2. Powyższe modyfikacje prowadzą do powstania aktywnej proteinazy składającej się z 1673 reszt aminokwasowych i wykazującej 45% podobieństwo do białek CEP obecnych u laktokoków [13, 58].

Kolejnym elementem budowy opisywanych białek enzymatycznych jest domena katalityczna (PR) (~500 aminokwasów), która należy do proteaz serynowych i jest najbardziej konserwatywną domeną. Za aktywność opisywanych enzymów odpowiedzialne są aminokwasy: kwas asparaginowy (D), histydyna (H) i seryna (S). W obszarze domeny katalitycznej PrtH została zidentyfikowana dodatkowa sekwencja (Rys. 1) tzw. domena inercyjna (I) (~150 reszt aminokwasowych), której rola nie jest do końca poznana. Przypuszczalnie bierze ona udział w procesie fałdowania oraz ogrywa rolę w kształtowaniu się specyfiki substratowej białek enzymatycznych, domena ta nie występuje w PrtH2 [66].

Nieznana jest także funkcja domeny A (~400 aminokwasów). Domena B (~500 aminokwasów) prawdopodobnie bierze udział w stabilizowaniu domeny katalitycznej oraz bierze udział w procesie autokatalizy, jest obecna u większości CEPs, ale nie występuje w PrtS u *Streptococcus thermophilus*. Wchodząca w skład PrtH domena B ma strukturę β-kartki i jest bogata w tyrozynę (11%) oraz lizynę (12%), w budowie tej domeny nie stwierdzono obecności cysteiny oraz metioniny [73].

Struktura drugorzędowa domeny H jest helisą o długości około 200 aminokwasów i jest ona zaangażowana w utrzymywaniu odpowiedniego ustawienia domen A oraz B poza ścianą komórki. Obecność tej domeny stwierdzono jedynie w budowie PrtP (210 reszt aminokwasowych), PrtS (367 aminokwasów) oraz PrtH (72 aminokwasy) (Rys.1). Skład aminokwasowy domeny H stanowią odpowiednio: lizyna (22%), alanina (21%), kwas asparaginowy (17%) oraz leucyna (13%) [73].

Hydrofobowa domena W (~100 aminokwasów) pełni funkcję łącznika kompleksu wszystkich opisanych domen ze ścianą komórki [8]. Interesujące jest 32% podobieństwo składu aminokwasowego C-końcowego fragmentu PrtH (aminokwasy 1538–1639) do C-końcowego fragmentu białka powierzchniowego S bakterii *Lactobacillus acidophilus* [58].

Mechanizm odpowiadający za zakotwiczenie białka CEP w błonie komórkowej *Lactobacillus helveticus* znacząco różni się od tego, jaki powszechnie występuje wśród bakterii LAB. Na C-końcu PrtH oraz PrtH2 nie zidentyfikowano obecności typowej dla białek CEP sekwencji sygnałowej (motyw LPxTG) odpowiedzialnej za kotwiczenie kompleksu domen [13].

Elementem różnicującym budowę białek CEP u poszczególnych bakterii jest domena zakotwiczona w błonie komórkowej (AN) zlokalizowana bezpośrednio za domeną W (Rys. 1). Jest ona fragmentem wchodzącym w skład PrtP oraz PrtS [51, 69].

Proteinazy związane z powierzchnią komórek bakterii *L. helveticus* oraz *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (PrtH, PrtB) nie posiadają domeny kotwiczącej w błonie, są związane ze ścianą komórkową jedynie za pomocą domeny W [58, 69, 73].

L e e n h o u t s przedstawił dwa różne mechanizmy kotwiczenia białek CEP do powierzchni komórek bakterii mlekowych. Pierwszym sposobem przyłączenia białek CEP do bakteryjnej komórki jest wiązanie kowalencyjne pomiędzy motywem LPxTG białka CEP i peptydowymi wiązaniami peptydoglikanu ściany komórki. Drugą możliwością jest elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy dodatnio naładowanym C-końcem białka CEP i ujemnie naładowanymi resztami kwasów techojowych, bakteryjnej ściany komórkowej [38]. PrtH jest prawdopodobnie przymocowane do ściany komórkowej za pomocą podobnego mechanizmu, jaki bierze udział w przytwierdzaniu do powierzchni komórki białek powierzchniowych S (S-layer protein) [38, 58, 69]. Sugeruje się również, iż białka CEP są połączone z komórką bakterii poprzez oddziaływania sił elektrostatycznych [58, 70].

Białka CEP wykazują różną specyfikę substratową w stosunku do kazeiny – białka najobficiej występującego w mleku. Jest to kryterium podziału białek CEP na kilka typów enzymów. Typ P_I – w pierwszej kolejności rozkłada enzymatycznie β-kazeinę, hydrolizując ją na ponad 100 różnych związków (oligo- i polipeptydów) zawierających od 4 do 30 reszt aminokwasowych, enzym ten zdecydowanie słabiej hydrolizuje κ- kazeinę. Typ P_{III} hydrolizuje zarówno α_{s1}-, α_{s2}-, β- jak i κ-kazeinę. Występujące u rodzaju *Lactobacillus* białka CEP zaliczane są zarówno do typu P_I, P_{III} jak i pośredniego P_I/P_{III} [8].

2.2. Mechanizm katalitycznego działania CEP's

Miejsce działania białek CEP jest uzależnione od postaci oraz fakcji białka mleka (α_{s1}-, α_{s2}-, β- lub κ-kazeiny). Ostatnie badania dowiodły, iż zarówno aktywność proteolityczna jak i swoistość względem kazeiny w czystej postaci oraz miceli kazeinowych w mleku jest odmienna u różnych szczepów *L. helveticus*. Mimo dużej, szczepowej specyfiki cięcia kazeiny potwierdzono obecność dwóch specyficznych miejsc działania enzymu: Phe_{190}-Leu_{191} oraz Glu_{175}-Lys_{176} dla czterech z piętnastu przebadanych szczepów *L. helveticus* [66].

Frakcja α_{s1}-, jest szybciej hydrolizowana w porównaniu do frakcji β-kazeiny. Kinetyka procesu hydrolizy α_{s1}-kazeiny była znacznie większa w przypadku szczepów posiadających dwa białka enzymatyczne należące do CEPs w porównaniu do bakterii posiadających jeden typ proteaz serynowych związanych z powierzchnią własnej komórki. W wyniku enzymatycznej hydrolizy α_{s1}-kazeiny zidentyfikowano od 54 do 74 peptydów przy czym, 22–30% stanowiły peptydy uwolnione przy udziale jedynie PrtH2 podczas gdy 41–49% stanowiły peptydy powstałe w wyniku enzymatycznej aktywności PrtH oraz PrtH2. Długość powstałych peptydów mieściła się w zakresie 6–33 reszt aminokwasowych. Zidentyfikowano również regiony odporne na proteolityczne

działanie białek CEPs zarówno w β- jak i α_{s1}-kazeini [26, 66]. Wzór hydrolitycznej degradacji α_{s1}-kzeiny przez białka CEP *L. helveticus* jest zróżnicowany. Jedynie Ile_6 -Lys_7 , Gln_9 -Gly_{10} oraz Leu_{142} -Ala_{143} są wspólnymi dla większości bakterii *L. helveticus* miejscami enzymatycznego działania proteinaz należących do grupy PrtH. Pozostałe miejsca hydrolitycznego rozpadu α_{s1}-kazeiny są ściśle uzależnione od szczepu [22, 23, 66].

Fragment 1–23 α_{s1}-kazeiny jest głównym substratem hydrolizy α_{s1}-kazeiny przy udziale PrtH *L. helveticus*. W ośmiu badanych szczepach *L. helveticus* zaobserwowano cztery różne wzory trawienia α_{s1}-kazeiny [53]. Hydroliza α_{s1}-kazeiny zachodzi głównie na N-końcu łańcucha peptydowego, pomiędzy pierwszym a czterdziestym aminokwasem oraz we fragmencie znajdującym się pomiędzy 80 i 150 resztą aminokwasową [66]. Degradacja enzymatyczna zachodzi również na C-końcu łańcucha, jednak w znacznie mniejszym stopniu i odnosi się ona do fragmentu sekwencji α_{s1}-kazeiny znajdującego się pomiędzy 170, a 199 aminokwasem. Bakterie *L. helveticus* w zależności od posiadanych typów CEP wykazują odmienne profile produktów powstałych po hydrolizie α_{s1}-kazeiny: PrtH jest odpowiedzialny za uwolnienie fragmentów α_{s1}-CN(1–16), α_{s1}-CN(17–23), α_{s1}-CN(1–17) oraz α_{s1}-CN(18–23), natomiast miejsca specyficznego cięcia PrtH2 dotycząα_{s1}-CN(1–9), α_{s1}-CN 10–23), α_{s1}-CN(1–16) i α_{s1}-CN(9–23) [58].

Niektóre specyficzne miejsca hydrolitycznego działania białek CEP na α_{s1}-kazeinę są wspólne dla większości szczepów np., Met_4-Glu_5, Glu_5-His_6, Lys_{24} -Asn_{25}. Pozostałe regiony są najprawdopodobniej niedostępne dla proteinaz CEP [66].

Frakcja κ-kazeiny nie jest hydrolizowana przez CEP należące do *Lb. helveticus*, lub jest ona degradowana jedynie w niewielkim stopniu [22, 70].

2.3. Geny kodujące białka CEP oraz mechanizmy kontrolujące ich biosyntezę

Wiele bakterii kwasu mlekowego posiada unikalne i charakterystyczne dla siebie proteinazy związane z powierzchnią własnej komórki. Wśród białek CEP najlepiej poznane i opisane na poziomach genetycznym i biochemicznym są: PrtP zidentyfikowane u szczepów *Lactococcus lactis* [29,31], PrtS występujące u *Streptococcus thermophilus* [8], PrtB u *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [14] oraz PrtR u *L. rhamnosus* [56, 86]. Bakterie należące do grupy LAB zazwyczaj posiadają tylko jeden typ CEP, jednak u *L. bulgaricus* oraz *L. helveticus* odnotowano obecność dwóch różnych proteinaz związanych z powierzchnią komórki bakterii [58, 80].

W szczepie *L. helveticus* CNRZ32 proteazy PrtH i PrtH2 związane z powierzchnią komórki (kodowane przez geny *prtH* i *prtH2*) przyczyniają się do wysokiej aktywności proteolitycznej tych bakterii [14, 77]. Częściowe zsekwencjonowanie produktów reakcji PCR ujawniło istnienie różnych alleli zarówno dla genu *prtH2* jak i *prtH*. Pomimo podobnej masy cząsteczkowej białka PrtH i PrtH2, pod względem sekwencji aminokwasowych są jedynie w 22% podobne do siebie [13].

Przeprowadzone ostatnio badania molekularne tego szczepu doprowadziły do wyodrębnienia dodatkowych genów *prtH3* i *prtH4* również kodujących białka CEP [4, 26]. Jednak ich dokładna budowa oraz specyfika działanie nie są w pełni poznane i wymagają dalszych analiz.

Wśród szczepów należących do *L. helveticus* stwierdzono możliwość występowania różnych kombinacji genów kodujących CEP: *prtH2*/*prtH3, prtH3*/*prtH4* lub *prtH*/*prtH2*/*prtH3*/*prtH4*. Najnowsze badania wskazały, iż taka różnorodność zestawień omawianych genów może prowadzić do odmiennych poziomów aktywności białek CEP u poszczególnych szczepów. Niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu określenia procentowego udziału czterech różnych białek CEP u *L. helveticus* i zbadanie ich wzajemnego oddziaływania na poziomie aktywności enzymatycznej oraz specyfiki substratowej [66].

Bakterie *L. helveticus* wydają się być wyjątkowymi pod względem zmienności liczby genów białek CEP wśród wszystkich bakterii kwasu mlekowego [56, 57].

U bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris,* gen *prtP* poprzedzony jest transkrypcją genu lipoproteinzy *(prtM)* związanej z błoną komórkową (PrtM), niezbędnej do autokatalitycznego dojrzewania PrtP [20]. Zarówno gen *prtP* jak i *prtM L. lactis* są zlokalizowane na plazmidzie natomiast u termofilnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* geny kodujące białka CEP znajdują się na chromosomie bakteryjnym [39, 58]. W genie *prtH* bakterii *L. helveticus* ROSELL 5089 stwierdzono obecność mobilnych elementów ILS2 [8].

Regulacja procesu biosyntezy białek CEP u LAB odbywa się na poziomie transkrypcji. W procesie kontrolującym powstawanie proteinaz związanych z powierzchnią komórek bakterii, główną rolę odgrywa represor CodY (Rys. 2), jest on również zaangażowany w kontrolę biosyntezy wielu innych białek. W odpowiedzi na wysoką zawartość wewnątrzkomórkowych aminokwasów (leucyny, izoleucyny i waliny) CodY przyłącza się do odpowiedniego miejsca na łańcuchu DNA, do sekwencji AATTTTCWGAAAATT (tzw. CodY-box) [19, 24, 59]. Miejsce to zlokalizowane jest w regionie promotorowym genów proteolitycznych lub bezpośrednio przed nim. Przyłączenie represora prowadzi do zahamowania ekspresji białek, tym samym uniemożliwiając uwalnianie aminokwasów na drodze enzymatycznej degradacji kazeiny. Jednakże, w przypadku bakterii *L. helveticus* nie stwierdzono obecności genu represora CodY ani żadnego genu homologicznego do *codY*, nie zidentyfikowano także sekwencji odpowiadającej CodY-box. W dalszym ciągu nieznane są mechanizmy odpowia-

dające za kontrolę i regulację proteolizy u *L. helveticus* i innych bakterii z tego rodzaju [3].

W innych badaniach wykazano, iż w podłożu hodowlanym bogatym w peptydy obniża się znacznie poziom biosyntezy białek CEP, co stało się podstawą do powstania hipotezy występowania peptydo-zależnego mechanizmu kontroli ekspresji genów *prtH* odbywającego się na poziomie transkrypcyjnym [22].

3. Mechanizm działania systemu proteolitycznego *Lactobacillus helveticus*

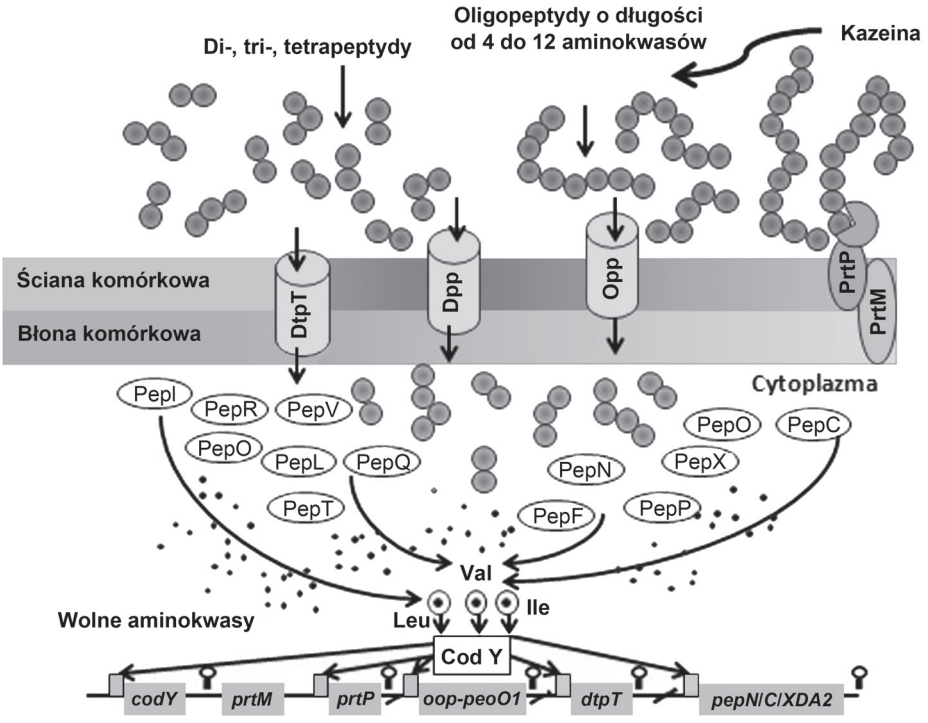
Oligopeptydy będące produktem reakcji hydrolizy kazeiny są transportowane do wnętrza komórki bakterii *L. helveticus*. Transfer ten odbywa się przy udziale białka transportowego (DtpT), podobnego do DtpT obecnego u *Lactococcus lactis* [48]. Gen kodujący to białko (*dtpT*) znajduje się w sąsiedztwie genu *pepN* kodującego aminopeptydazę N. Zaobserwowano, iż ekspresja *dtpT* nasila się podczas hodowli drobnoustrojów w pożywce bogatej w peptydy (MRS), zjawisko to nie występuje podczas inkubacji w mleku. DtpT (Rys. 2 i 3) jest proteiną transmembranową z C- i N- końcem zakotwiczonym w cytoplazmie komórki. Transporter ten należy do rodziny PTR i napędzany jest siłą protonomotoryczną [77].

Dokładny mechanizm transportu dużych peptydów generowanych przez CEP *L. helveticus* jest nadal nieznany i większość informacji opiera się na mechanizmie analogicznym systemie występującym *L. lactis*, u których oligopeptydy (o długości od 4 do 18 aminokwasów) oraz peptydy niskocząsteczkowe wnikają do wnętrza komórek za pośrednictwem systemu transportu aminokwasów, di- i tri-peptydów oraz oligopeptydów (Opp) [46].

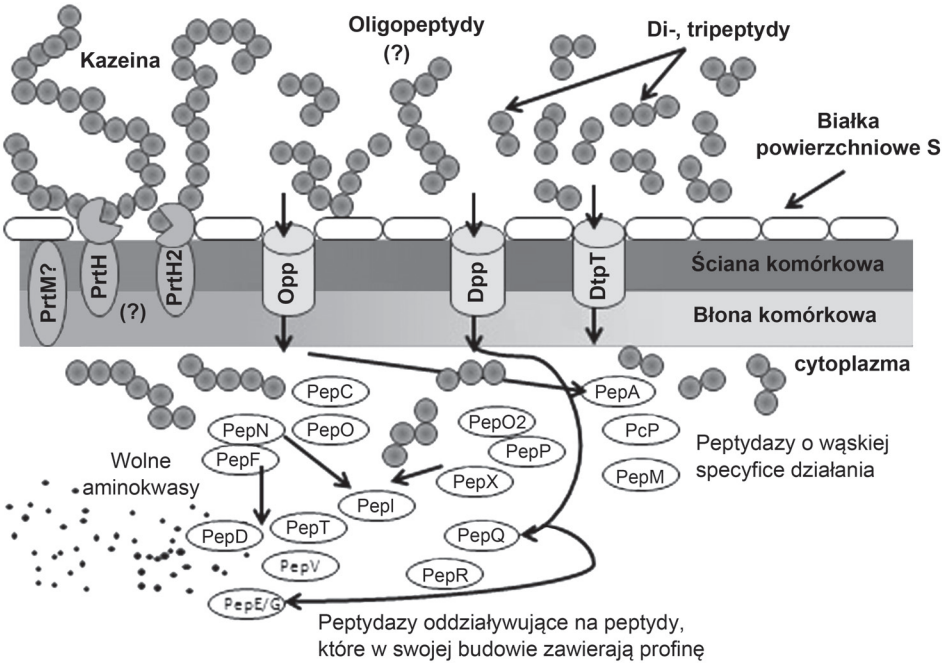
Opp składa się z kompleksu pięciu podjednostek białkowych, w skład którego wchodzą: OppA- lipoproteina zbudowana z 35 reszt aminokwasowych, zlokalizowana na ścianie komórkowej i zakotwiczona w błonie komórkowej lipidowym N-końcem- jest odpowiedzialna za przyłączanie substratu [7], dwa integralne białka błonowe (OppB i OppC) oraz dwa białka związane z błoną cytoplazmatyczną zdolne do wiązania z ATP (OppD i OppF). U *L. lactis* geny kodujące ten 5-białkowy kompleks są zlokalizowane w dwóch następujących po sobie operonach *oppDFBC* i *oppA*. Analiza mikromacierzy *L. helveticus* CNRZ 32 wykazała, że ekspresja genów *opp* (tak jak *prtH* i *prtH2*) była wyższa w przypadku hodowli bakterii w mleku, co sugeruje że u *L. helveticus* w transport oligopeptydów zaangażowany jest, opisany u *L. lactis* transporter oligopeptydowy Opp [77].

Opp to transporter ABC (ATP-Binding Cassette Transporters) posiadający kasetę wiążącą ATP, a uwalniana w wyniku hydrolizy ATP energia jest wykorzystywana do przemieszczenia oligopeptydów do cytoplazmy komórki [7].

Przypuszcza się iż w transport produktów hydrolitycznego rozkładu kazeiny do wnętrza komórki może być także zaangażowany drugi transporter ABC (Opt). Został on uprzednio zidentyfikowany u *Lactococcus lactis* MG1363 i opisany jako Dpp. Obecność kodonu



Rys. 2. Schemat systemu proteolitycznego oraz regulacji ekspresji genów występujące u bakterii *Lactococcus lactis.*
Na podstawie [66] dzięki uprzejmości i za zgodą wydawnictwa Elsevier [69], dzięki uprzejmości i za zgodą autorów



Rys. 3. Schematyczne systemu proteolitycznego występującego u *L. helveticus*, na podstawie systemu proteolitycznego obecnego u dotychczas poznanych bakterii mlekowych. Sposób wiązania się białek PrtH do powierzchni komórek bakterii i, obecność białka PrtM jak i wielkość transportowanych przez błonę oligopeptydów w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnionymi kwestiami u bakterii *L. helvetius*. Na podstawie [66] za zgodą wydawnictwa Elsevier [69], dzięki uprzejmości i za zgodą autorów]

stop w genie *dppP* ogranicza specyficzność substratową Dpp do di-i tripeptydów. Transporter ten składa się z dwóch białek wiążących oligopeptydy (OptA i OptS), jednak tylko OptA uczestniczy w transporcie pozakomórkowych oligopeptydów [36]. Przypuszczanie Opt występuje także u *L. helveticus* [39].

Najprawdopodobniej obecność dwóch systemów wychwytu oligopeptydów może zwiększyć wydajność transportu, a w konsekwencji zwiększyć możliwość przyswajania produktów rozpadu kazeiny przez bakterie, co z kolei sprzyja ich rozwojowi w mleku [66].

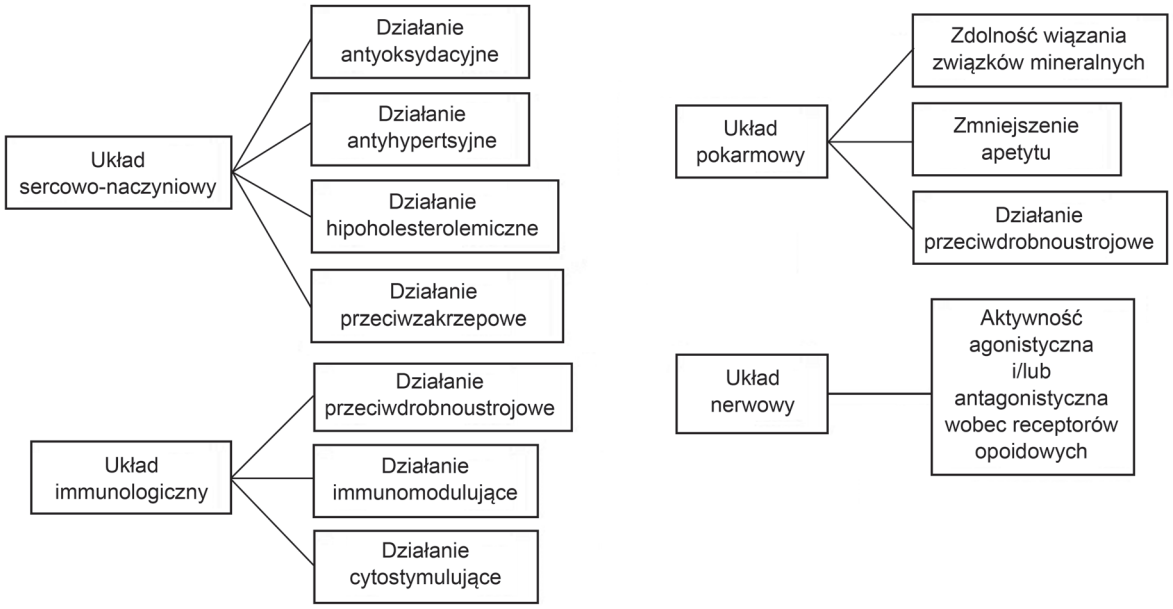
Obecne w cytoplazmie wewnątrzkomórkowe peptydazy (Rys. 3): tripeptydazy (PepT), dipeptydazy (PepV, PepD, PepDA), peptydazy prolinowe (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), aminopeptydazy (PepN, PepC, PepA, PepS, PepL, PCP) endopeptydazy (PepO, PepF) rozkładają pobrane peptydy do wolnych aminokwasów. Mogą one ulegać dalszym przemianom biochemicznym m.in. reakcjom dehydrogenacji, redukcji, transaminacji, czy dekarboksylacji z jednoczesnym wytworzeniem takich produktów jak: kwasy tłuszczowe, aldehydy, ketony, laktony, estry, alkohole i innych związków [44].

4. Znaczenie i możliwości praktycznego wykorzystania systemu proteolitycznego bakterii *Lactobacillus helveticus*

Obecnie co raz częściej bakterie *L. helveticus* są stosowane w produkcji wyrobów mleczarskich jako kultury starterowe, głównie dzięki wysokiej tolerancji na niskie pH oraz szybkość z jaką ukwaszają mleko. Są w stanie obniżyć wartość pH mleka do 3,5 podczas gdy *Lactococcus lactis* i *S. thermophilus* hamują swój rozwój i zdolność do jego zakwaszania przy pH 4,3 [52].

Procesy proteolityczne mają szczególne znaczenie w technologii produkcyjnej żywności, są kluczowym etapem zachodzącym podczas dojrzewania serów, wpływają na teksturę oraz smak [78]. Rodzime proteinazy mleka np. plazmina (E.C.3.4.21.7) oraz enzymy koagulujące np. podpuszczka, chymozyna (rennina, E.C. 3.4.23.4) dodawane podczas procesu technologicznego wstępnie hydrolizują cząsteczki kazeiny. Jednakże to właśnie proteinazy CEP są uważane za główny czynnik odpowiedzialny za zachodzące podczas dojrzewania sera procesy proteolityczne [46].

Spośród wszystkich bakterii kwasu mlekowego *L. helveticus* charakteryzują się najwyższą aktywnością proteolityczną [68]. Ponadto, duża zdolność tych bakterii do proteolizy białek mleka przyspiesza proces dojrzewania sera [6, 40]. *L. helveticus* jest często stosowany w połączeniu *z Lactococcus lactis* oraz *L. paracasei.* Obecność w składzie zakwasu serowarskiego *L. helveticus* w produkcji serów typu szwajcarskiego, czy też Mozzarella wpływa na ich właściwości technologiczne, takie jak rozciągliwość i topliwość. Rozciągliwość pod koniec dojrzewania serów typu szwajcarskiego w rzeczywistości jest 2,5 razy większa w przypadku produktów wytwarzanych z udziałem *L. helveticus* niż z *L. delbrueckii* subsp. *lactis* [61]. Jest to związane z aktywnością i specyfiką białek CEP oraz innych bakteryjnych pep-



Rys. 4. Prozdrowotne efekty biopeptydów uwalnianych z białek mleka na drodze bakteryjnej proteolizy. Na podstawie [45].

tydaz wpływających na powstawanie peptydów o zróżnicowanych właściwościach [23, 54, 66].

Degradacja kazeiny przez peptydazy, jest źródłem powstawania składników wpływających na rozwój smaku, aromatu oraz tekstury produktu. W wyniku omawianego procesu enzymatycznego zostają uwolnione aminokwasy, aldehydy, kwasy, alkohole, substancje lotne, estry i inne składniki odpowiadające za cechy sensoryczne wyrobu. Na charakterystykę zachodzących procesów wpływa aktywność enzymatyczna i specyficzność substratowa enzymów proteolitycznych poszczególnych szczepów bakteryjnych [9]. Efektem hydrolitycznego rozkładu kazeiny jest także uwolnienie i nagromadzenie hydrofobowych peptydów bogatych w prolinę, odpowiadających za powstawanie niepożądanego gorzkiego smaku [79]. Ze względu na wysoką aktywność proteolityczną, szczepy *L. helveticus* mogą hydrolizować hydrofobowe peptydy takie jak peptyd β-CN (193–209) i w znacznym stopniu redukować gorzki smak sera [66]. Dotyczy to zastosowania kultur starterowych zawierających zarówno żywe jak i atentowane bakterie *L. helvetius* [30].

Eksperymenty *in vitro* wykazały, że mniejsza ilość gorzkich peptydów generowana jest podczas hydrolizy kazeiny przez szczepy posiadające proteinazy typu P_{III}, czyli większość szczepów *L. helveticus.* Proteinazy typu P_{III} początkowo rozszczepiają duże fragmenty kazeiny od C-końca w przeciwieństwie do proteinaz typu P_I, których aktywność i specyfika enzymatyczna bezpośrednio prowadzą do powstawania bardzo krótkich, gorzkich peptydów [84].

Bakteryjna proteoliza generuje również zestaw peptydów związanych z efektem prozdrowotnym. Łańcuchy oligopeptydowe powstałe dzięki aktywności proteolitycznej enzymów związanych z powierzchnią komórek bakterii są źródłem bioaktywnych peptydów powstających przy udziale wewnątrzkomórkowych peptydaz bakterii kwasu mlekowego. Peptydy bioaktywne wywołują m.in. efekty: hipocholesterolemiczny, antyoksydacyjny, przeciwzakrzepowy, immunomodulacyjny, antagonistyczny względem opioidów (Rys. 4), oraz efekt antybakteryjny [17, 21, 28, 32, 33, 42]. W przetwórstwie żywności, oprócz bezpieczeństwa zdrowotnego, niezwykle istotne jest posiadanie aktywności antagonistycznej wobec bakterii gnilnych i chorobotwórczych. Bakterie z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* hamują wzrost *Micrococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* [60]. U tych bakterii PrtR generuje oligopeptydy, z których w wyniku enzymatycznej aktywności wewnątrzkomórkowych peptydaz uwalniane są peptydy o właściwościach prozdrowotnych [64].

Bioaktywne peptydy zostały również zidentyfikowane w mleku fermentowanym przez *L. helveticus* pozytywny efekt zdrowotny tych specyficznych fragmentów białkowych zależy od ich składu i sekwencji aminokwasowej. Rozmiar bioaktywnych sekwencji jest zróżnicowany i może wynosić od dwóch do dwudziestu aminokwasów. Część peptydów wykazuje wielofunkcyjne właściwości [42, 71, 72, 75].

Najskuteczniejszym sposobem na zwiększenie zawartości bioaktywnych peptydów w fermentowanych produktach mlecznych (Tab. I) jest fermentowanie lub współfermentowanie pro duktu z zastosowaniem wysoko proteolitycznych szczepów LAB. Wybór szczepu ma istotne znaczenie dla skuteczności uwalniania tych krótkich łańcuchów peptydowych. Jeżeli zastosowany szczep posiada zbyt wysoką aktywność proteolityczną, wówczas następuje enzymatyczna hydroliza peptydów

Tabela I
Bioaktywne peptydy zidentyfikowane w fermentowanych produktów mlecznych (na podstawie [34] za zgodą wydawnictwa Elsevier)

Produkt	Przykład zidentyfikowanego bioaktywnego peptydu	Bioaktywne działanie	Piśmiennictwo
Typ sera Parmigiano–Reggiano	β-cn f(8–16), β-cn f(58–77), α_{s2}-cnf(83–33)	Powstawanie fosfopeptydów	[1]
Cheddar	Fragmenty α_{s1-} i β-cn	Powstawanie fosfopeptydów	[74]
Mozzarella	β-cn f(58–72)	inhibitor ACE	[76]
Crescenza, Italico, Gorgonzola, Gouda	α_{s1-} -cn f(1–9), β-cn f(60–68)	inhibitor ACE	[67]
Festivo	α_{s1-} -cn f(1–9), α_{s1-} f(1–7), α_{s1-} f(1–6)	inhibitor ACE	[65]
Emmental	Fragmenty α_{s1-} i β-cn	Powstawanie fosfopeptydów, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe	[11]
Manchego	Fragmenty owczej α_{s1-} i β-cn	inhibitor ACE	[18]
Mleko fermentowane Zsiadłe mleko	β-cn f(74–76), β-cn f(84–86), κ-cn f(108–111)	antyhypertensyjne	[49]
Dahi	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	inhibitor ACE	[2]

Legenda: α_{s1-}-cn: α_{s1-}-kazeina, α_{s2}-cn: α_{s2}-kazeina, β-cn: β-kazeina, κ-cn: κ-kazeina

Tabela II
Przykłady bioaktywnych peptydów uwalnianych z białek mleka przez różne mikroorganizmy i ich enzymy (na podstawie [34] za zgodą wydawnictwa Elsevier)

Mikroorganizm	Białko prekursorowe	Sekwencja peptydu	Działanie bioaktywne	Piśmiennictwo
Lactobacillus helveticus, *Saccharomyces cerevisiae*	β-cn κ -cn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	inhibitor ACE antyhypertensyjne	[49, 50]
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	β-cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly Pro-Ile	inhibitor ACE	[2]
Streptococcus thermophilus + *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*	β-cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	inhibitor ACE	[2]
L. helveticus ICM 1004 Ekstrakt komórkowy	Hydrolizat odtłuszczonego mleka	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	inhibitor ACE	[56]
enzymy *Lactobacillus GG* + trypsyna i pepsyna	$\alpha_{s1\text{-}cn}$ β-cn	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	inhibitor ACE immuno stymuluące anatagoni styczna wobec receptorów opioidowych	[64]
Proteinaza *L. helveticus* CP90	β-cn	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-(Glu)	inhibitor ACE	[41]
L. helveticus CPN 4	białka serwatkowe	Tyr-Pro	inhibitor ACE	[89]
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* IFO13953	κ -cn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu--Ser-Phe-Met	Antyoksydacyjne	[35]
L. delbrueckii subsp. bulgaricus SS1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4	β-cn κ -cn	Wiele fragmentów	inhibitor ACE	[17]

bioaktywnych. Z tego też powodu, kluczowym elementem pozwalającym uzyskać wysokie stężenia peptydów bioaktywnych jest i dobór szczepu o znanej aktywności i specyfice enzymatycznej, posiadającego odpowiednie właściwości proteolityczne (Tab. II).

Większość badań koncentruje się na przeciwnadciśnieniowym wpływie peptydów wytwarzanych przez szczepy *L. helveticus* [10, 27]. Wykazano, iż spożywanie mleka fermentowanego przez *L. helveticus* wpływało na obniżenie ciśnienia krwi u pacjentów z nadciśnieniem [71, 72]. Powyższy efekt był wynikiem obecności inhibitorów konwertazy angiotensyny (*Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors*, *ACEI*) pochodzących głównie z β-kazeiny (Rys.5) [10, 63]. Wśród nich peptydy, Val--Pro-Pro (VPP) i Ile-Pro-Pro (IPP) wykazują najwyższe właściwości antyhypertensywne [49, 50], a ich obecność zidentyfikowano w mleku fermentowanym przez szczep *L. helveticus* i *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. II).

Działanie peptydaz jest uzależnione w dużej mierze od warunków wzrostu bakterii, co pozwala do pewnego stopnia na kontrolowanie powstawania bioaktywnych peptydów. W zależności od użytego szczepu jak również temperatury, pH stężenia soli oraz rodzaju i dostępności źródła węgla i azotu w podłożu hodowlanym można uzyskać różne produkty procesu hydrolizy białka [87].

Stężenie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE--inhibitors) w produkcie zależy od równowagi pomiędzy szybkością powstawania tych peptydów, a procesami ich enzymatycznej inaktywacji, co z kolei jest uzależnione od bakteryjnych systemów proteolitycznyh oraz czasu i warunków podczas dojrzewania sera [34]. Stężenie bioaktywnych peptydów w serze wzrasta podczas jego dojrzewania, ale zaczyna spadać, gdy zachodzące procesy proteolityczne przekroczą pewien poziom. Aktywność biopeptydów (inhibitorów ACE) jest zdecydowanie mniejsza w produktach o niskim stopniu proteolizy np. twaróg, jogurt czy też świeży ser (Tab. I). Zauważono, iż omawiane peptydy pojawiają się stopniowo podczas dojrzewania sera, a ich stężenie w serze typu Gouda jest najwyższe w 13 tygodniu dojrzewania, po czym powoli maleje [65].

Bioaktywne peptydy mogą powstawać także w przewodzie pokarmowym po spożyciu sera. Wyniki badań sugerują, iż generacja inhibitorów ACE podczas trawienia w przewodzie pokarmowym zależy od masy cząsteczkowej peptydów prekursorowych obecnych w spożywanym serze [25].

Przy doustnym podawaniu mleka fermentowanego przez szczep *L. helveticus* R385 stwierdzono wystąpienie innych korzystnych właściwości w tym np. stymulację układu odpornościowego, poprzez zwiększenie liczby przeciwciał IgA oraz limfocytów B w jelicie cienkim [37, 82]. Szczepy *L. helveticus* hamowały również wzrost włókniakomięsaka u myszy (wzrost liczby komórek apoptotycznych w obwodzie guzu) i rozwój *Salmonella enterica* Typhimurium [66]. Hydrolizaty białek mleka oraz serwatki pochodzące z proteolitycznego rozkładu kazeiny poprawiały funkcjonowanie układu odpornościowego poprzez zwiększenie proliferacji limfocytów oraz przeciwciał, jak również syntezę cytokin [15]. Szczególnie interesujące są peptydy uwalniane podczas fermentacji mleka w obecności bakterii kwasu mlekowego, które regulują wytwarzanie cytokin i stymulują aktywność fagocytarną makrofagów [45].

Większość zidentyfikowanych peptydów bioaktywnych, będących produktem proteolizy α_{s1}-kazeiny przy udziale bakterii LAB, ma zdolność do hamowania peroksydacji lipidów [62].

Jednakże, zarówno peptydy biorące udział w tych działaniach, jak i wszystkie enzymy proteolityczne uczestniczące w ich produkcji w większości nie są zidentyfikowane i w pełni poznane [66, 83].

5. Podsumowanie

Spośród wszystkich bakterii kwasu mlekowego, *Lactobacillus helveticus* charakteryzuje się najwyższą aktywnością proteolityczną, która jest związana z występowaniem wyspecjalizowanego sytemu proteolitycznego. Jego zasadniczym elementem są proteinazy związane z powierzchnią komórki (CEP). Szczepy bakterii tego gatunku wydają się być wyjątkowymi pod względem zmienności liczby genów białek CEP wśród wszystkich bakterii kwasu mlekowego. Ze względu na wysoką aktywność proteolityczną oraz unikalne właściwości, szczepy *L. helveticus* znajdują zastosowanie w przemyśle mleczarskim. Procesy proteolityczne prowadzane przez te bakterie mają szczególne znaczenie w technologii produkcji żywności, w znacznym stopniu kształtują smak aromat oraz teksturę produktów mlecznych. Ponadto, bakterie *L. helveticus* przyczyniają się do powstawania bioaktywnych peptydów nadających żywności walory prozdrowotne. Regulacja procesu biosyntezy białek CEP bakterii *L. helveticus* jak również dokładna charakterystyka tych enzymów wciąż stanowi przestrzeń do dalszych badań i analiz.

6. Piśmiennictwo

1. Addeo F., Chianes L., Salzano A., Sacchi R., CappuccioV., Ferranti P., Malorni A.: Characterization of the 12% trichloroacetic acidinsoluble oligopeptides of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* **59**, 401–411 (1992)
2. Ashar M. N., Chand R. : Fermented milk containing ACE inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, **59**, 363–366 (2004)
3. Azcarate-Peril M. A., Mc Auliffe O., Altermann E., Lick S., Russell W.M., Klaenhammer T. R.: Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5794–5804 (2005)
4. Broadbent J. R., Altermann E. i wsp.: Comparative genome analysis of the obligately homofermentative lactic acid bacterium *Lactobacillus helveticus*. 9th Int. Symp. Lactic Acid Bacteria. The Netherlands. Poster A 063. (2008)
5. Christensen J.E., Steele J.L.: Impaired growth rates I milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements *J. Bacteriol.* **185**, 3297–3306 (2003)
6. Courtin P., Nardi M., Wegmann U., Joutsjcki V., Ogier J.C., Gripon J.C., Palva A., Henrich B., Monnet V.: Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactobacillus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. *Int. Dairy J.* **12**, 447–454 (2002)
7. Detmers F.J.M., Kuni E.R.S., Lanfermeijer F.C., Poolman B., Konings W.N.: Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis. Biochemistry*, **37**, 16671–16679 (1998)
8. Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V., Rul F.: *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4772–4778 (2000)

9. Fira M., Kojic A., Banina I., Spasojevic I., Strahinic L., Topisirovic D.: Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 123–130 (2001)
10. Fuglsang A., Rattray F.P., Nilsson D., Nyborg N.C.B.: Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and in vivo. *Anton. Leeuw. Internat. J.G.* **83**, 27–34 (2003)
11. Gagnaire V., Molle D., Herrouin M., Leonil J.: Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4402–4413 (2001)
12. Gajewska J., Błaszczyk M.K: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
13. Genay M., Sadat L., Gagnaire V., Lortal S.: prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol*., **75**, 3238–3249 (2009)
14. Gilbert C., Blanc B., Frot-Coutaz J., Portalier R., Atlan D.: Comparison of cell surface proteinase activities within the Lactobacillus genus. *J. Dairy Res*. **64**, 561–571 (1997)
15. Gill H. S., Doull F., Rutherfurd K. J., Cross, M. L: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* **84** (suppl. 1), 111–117 (2000).
16. Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F.: Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**, 3898–3904 (2000)
17. Gobetti M., Minervini F., Rizzello C. G.: Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 173–188 (2004)
18. Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I.: Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* **12**, 697–706 (2002)
19. Guédon E., Renault P., Ehrlich S.D., Delorme C.: Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* **183**, 3614–3622 (2001)
20. Haandrikman A., Kok J., Venema G.: Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein. *J. Bacteriol.* **173**: 4517–4525 (1991)
21. Hartmann R., Meisel H.: Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol*. **18**, 163–169 (2007)
22. Hebert E.M., Raya R.R., De Giori G.S.: Nutritional requirements and nitrogendependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5316–5321 (2000)
23. Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., Raya R.R., De Giori G.S., Ferranti P., Addeo F.: Characterization of the pattern of a s1- and β-casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3682–3689 (2008)
24. Hengst C.D., Sacha A.F.T., Geurts, J.M.W., Nauta A., Kok J., Kuipers O.P.: The Lactococcus lactis CodY Regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J. Biol. Chem*. **280**, 34332–34342 (2005)
25. Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Ramos M., Recio I.: Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agric. Food Chem*. **52**, 1504–1510 (2004)
26. Jensen M.P., Vogensen F.K., Ardo Y.: Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *Int. Dairy J.* **19**, 661–668 (2009)
27. Kilpi E.E.R., Kahala M.M., Steele J.L., Pihlanto A.M., Joutsjoki V.V.: Angiotensin Iconverting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Int. Dairy J.* **17**, 976–984 (2007)
28. Kitts D.D., Weiler K.: Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1309–1323 (2003)
29. Kiwaki M., Ikemura H., Shimizu-Kadota M., Hirashima A.: Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO763. *Mol. Microbiol.* **3**, 359–369 (1989)
30. Klein N., Lortal S.: Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening. a review. *Int. Dairy J*. **9**, 751–762 (1999)
31. Kok J., Leenhouts K., Haandrikman A.J., Ledeboer A., Venema G.: Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 231–238 (1988)
32. Korhonen H., Pihlanto-Leppälä, A.: Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. *IDF Bulletin*, **363**, 17–26 (2001)
33. Korhonen H., Pihlanto A.: Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1297–1308 (2003)
34. Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**, 945–960 (2006)
35. Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K., Oki T.: Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Jpn. J. Soc. Food Sci.* **48**, 44–50 (2001)
36. Lamarque M., Charbonnel P., Aubel D., Piard J.C., Atlan D., Juillard V.: A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus Lactococcus. *J. Bacteriol.* **186**, 6492–6500 (2004)
37. Leblanc J.G., Matar C., Valdez J.C., Leblanc J., Perdigon G.: Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* **85**, 2733–2742 (2002)
38. Leenhouts K., Buist G., Kok J.: Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 367–376 (1999)
39. Liu M., Bayjanov J. R., Renckens B., Nauta A., Siezen R.J.: The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **2010** *BMC Genomics*, 11 (2010)
40. Luoma S., Peltoniemi K., Joutsjoki V. , Rantanen T., Tamminen M. , Heikkinen I., Palva A.: Expression of Six Peptidases from Lactobacillus helveticus in Lactococcus lactis *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1232–1238 (2001)
41. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. : Isolation of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from Lactobacillus helveticus CP790. *J. Dairy Sci.* **79**, 1316–1321 (1996)
42. Matar C., Valdez J.C., Medina M., Rachid M., Perdigon G.: Immunomodulating effects of milks fermented by Lactobacillus helveticus and its non-proteolytic variant. *J. Dairy Res.* **68**, 601–609 (2001)
43. Matar C., LeBlanc J. G., Martin L., Perdigón G.: Biologically active peptides released in fermented milk: Role and functions. In: E.R. Farnworth. Editor. Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. CRC Press. Florida. USA, s. 177–201 (2003)
44. McSweeney P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 127–144 (2004)
45. Meisel H., Fitz Gerald R.J.: Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des*. **9**, 1289–1295 (2003).

46. Misk-Krajnik M. H.: Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holenderskiego**.** *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **1**, 45–59 (2012)
47. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakarai T., Yura S.: Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: genetic lesions a.ecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64–71 (1981)
48. Nakajima H., Hagting A., Kunji E.R.S., Poolman B., Konings W.N.: Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the di- and tripeptide transport protein of Lactobacillus helveticus. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2213–2217 (1997)
49. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T.: Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 777–783 (1995a)
50. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano,T.: Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin Iconverting enzyme. *J. Dairy Sci.* **78**, 1253–1257 (1995b)
51. Navarre W.W., Schneewind O.: Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in grampositive bacteria. *Mol. Microbiol.* **14**, 115–121 (1994)
52. Nielsen M.S., Martinussen T., Flambard B., Sorensen K.I., Otte J.: Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* **19**, 155–165 (2009)
53. Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M., McMahon D.J.: Diversity in specificity of the extracellular proteinases in Lactobacillus helveticus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 455–460 (2002)
54. Oomme, B.S., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M.: Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus influences functional properties of mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* **85**, 2750–2758 (2002)
55. Pan D., Luo Y., Tanokura M.:Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chem.* **91**, 123–129 (2004)
56. Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L., Jovanovic G.: Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5802–5811 (2003)
57. Pastar I., Fira D., Strahinic I., Krstic K., Begovic J., Topisirovic L., Jovanovi, G.: Analysis of the presence of prtR proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus. Folia Microbiol.* **51**, 535–541 (2006)
58. Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C., Steele J.L.: Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from Lactobacillus helveticus CNRZ32. *J. Bacteriol.* **181,** 4592–4597 (1999)
59. Petranovic D., Guédon E., Sperandio B., Delorme C., Ehrlich S.D., Renault P.: Intracellular effectors regulating the activity of the Lactococcus lactis CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* **53**, 613–621 (2004)
60. Polak-Berecka M, Waśko A., Koston D.: Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska, Sectio C*, **64**, 15–24 (2009)
61. Richoux R., Aubert L., Roset G., Kerjean J.R.: Impact of the proteolysis due to lactobacilli on the stretchability of Swiss-type cheese. *Dairy Sci. Technol.* **89**, 31–41 (2009)
62. Rival S.G., Fornaroli S., Boeriu C.G., Wichers H.J.: Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J. Agric. Food Chem.* **4**, 287–294 (2001)
63. Robert M.C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M.A.: Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6923–6931 (2004)
64. Rokka T., Syväoja, E-L., Tuomine, J., Korhonen H.: Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT-milk. *Milchwissenschaft,* **52**, 675–678 (1997)
65. Ryhänen E. L., Pihlanto-Leppälä A., Pahkala, E.: A new type of ripened; low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* **11**, 441–447 (2001)
66. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V.: Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review *Int. J. Food Microbiol.* **146**, 1–13 (2011)
67. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh, T.: Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* **83**, 1434–1440 (2000)
68. Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T.: Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. Dairy Res.* **62**, 601–610 (1995)
69. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 394–406 (2006)
70. Scolari G., Vescovo M., Zacconi C., Vescovi F.: Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2. *J. Dairy Sci.* **89**, 3800–3809 (2006)
71. Seppo L., Kerojoki O., Suomalainen T., Korpela R.: The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension, a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, **57**, 124–127 (2002)
72. Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R.: A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr*. **77,** 326–330 (2003)
73. Siezen R.J.: Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76,**139–155 (1999)
74. Singh T.K., Fox P.F., Healy A.: Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **64**, 433–443 (1997)
75. Singh B., Chand R.: Antioxidative activity of bovine milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Milchwissenschaft*, **61**, 63–65 (2006)
76. Smacchi E., Gobbetti M.: Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb. Technol*. **22**, 687–694 (1998)
77. Smeianov V.V., Wechter V.P., Broadbent J.R., Hughes J.E., Rodriguez B.T., Christensen T.K., Ardo Y., Steele J.L.: Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl. Environ. Microbiol*. **73**, 2661–2672 (2007)
78. Smit G., Smit B., Engels W.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 591–610 (2005)
79. Smukowski M., Wendroff W.L., Ping, Y., Rao R.D.: Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.* **86** (suppl. 1), 364 (2003)
80. Stefanitsi D., Sakellaris G., Garel J.R.: The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus. FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 53–58 (1995)

81. Takano T.: Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 333–340 (2002)
82. Vinderola G., Matar C., Palacios J., Perdigon G.: Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 180–186 (2007)
83. Vinderola G., Matar C., Perdigon G.: Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar *typhimurium* infection in mice. *Immunology*, **212**, 107–118 (2007b)
84. Visser S.: Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci*. **76,** 329–350 (1993)
85. Wakai T., Yamamoto N.: Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk. Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life 2012, s. 159–172 (2012)
86. Waśko A., Kieliszek M., Targoński Z.: Purification and characterization of a Proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Oxy. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **42**, 476–488 (2012)
87. Williams A.G., Noble J., Tammam J., Lloyd D., Banks J.M.: Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **12**, 841–852 (2002)
88. Yamamoto N., Akino A., Takano T.: Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 776–778 (1994)
89. Yamamoto N., Maeno M., Takano T.: Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* **82**, 1388–1393 (1999)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 61–69
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNA DEGRADACJA NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWZAPALNYCH

Urszula Guzik[1], Katarzyna Hupert-Kocurek[1], Danuta Wojcieszyńska[1]*

[1]Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 555, e-mail: biochem@us.edu.pl

Wpłynęło w grudniu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych. 3. Degradacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych metodami fizyko-chemicznymi. 4. Szlaki biologicznej degradacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych. 5. Podsumowanie

Microbial degradation non-steroidal anti-inflammatory drugs

Abstract: In the recent years, commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely detected in the environment. These biologically active substances and their continuous inflow into the environment may lead to their accumulation in the environment and chronic exposure of organisms. This in turn may cause the potential negative effects on living organisms. While the transformation mechanisms of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human body and in other animals have been extensively studied, degradation of these drugs by bacteria (including their degradation pathways and degradation products) has seldom been investigated and are largely unknown. Therefore, the objective of this paper is presentation actual stage of knowledge about microbiological degradation pathways of NSAIDs such as naproxen, ibuprofen, diclofenac, paracetamol.

1. Introduction, 2. Characterization of non-steroidal anti-inflammatory drugs, 3. Degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by physicochemical methods, 4. Pathways of biological degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs, 5. Conclusion

Słowa kluczowe: leki przeciwzapalne, degradacja, mikroorganizmy
Key words: anti-inflammatory drugs, degradation, microorganisms

1. Wprowadzenie

W drugiej połowie lat 90 ubiegłego wieku, Ternes [51] opublikował wyniki badań monitorujących stan niemieckich rzek i strumieni pod kątem zawartości w nich pozostałości farmaceutyków. W badanych wodach powierzchniowych stwierdził obecność 32 farmaceutyków i ich metabolitów. Po badaniach przeprowadzonych przez Ternes'a, informację na temat obecności pozostałości farmaceutyków w wodach powierzchniowych zaczęły docierać do prasy fachowej niemal ze wszystkich części Europy Zachodniej, a także z krajów Ameryki Północnej. Wraz z badaniami monitorującymi stan wód powierzchniowych, dokonano analiz odpływów z oczyszczalni ścieków (ścieków oczyszczonych) oraz ścieków surowych, trafiających na miejskie oczyszczalnie. Zarówno w ściekach surowych, jak i oczyszczonych, wykryte zostały znaczne ilości farmaceutyków, w stężeniach od kilkunastu ng/dm^3 do kilkuset μg/dm^3 [36, 48].

Głównym źródłem zanieczyszczeń środowiska wodnego farmaceutykami są gospodarstwa domowe oraz szpitale. Leki zażywane przez chorych, nie ulegają całkowicie metabolizmowi w ich organizmach i wraz z moczem lub kałem trafiają do systemu kanalizacji, a stamtąd kierowane są do oczyszczalni ścieków. Oprócz gospodarstw domowych i szpitali, jako następne w kolejności źródła zanieczyszczeń farmaceutykami wymieniane są jednostki diagnostyczne, zakłady farmaceutyczne, a także farmy zwierząt hodowlanych, gdzie podaje się w paszy antybiotyki, aby uchronić zwierzęta hodowlane przed ewentualnymi infekcjami [25, 55]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost produkcji farmaceutyków oraz ich nadmiernej konsumpcji. Staje się to poważnym zagrożeniem zwłaszcza dlatego, że farmaceutyki stanowią grupę aktywnych biologicznie i trwałych związków o potencjalnie negatywnym działaniu na różne ekosystemy [4, 11, 17]. Problem związany z obecnością leków w ekosystemach wodnych może się nasilać m.in. za sprawą rosnącej populacji ludzi, produkcji farmaceutyków oraz nadmiernej konsumpcji, zwłaszcza niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych (NLPZ), sięgającej w krajach wysokorozwiniętych nawet kilkuset ton rocznie. Polska jest na piątym miejscu w Europie pod względem ilości sprzedawanych bez recepty NLPZ. Liczbę osób zażywających w Polsce niesteroidowe leki przeciwzapalne szacuje się na około 4 mln [48].

2. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Właściwości lecznicze substancji pochodzenia naturalnego zawierających salicylany były znane od czasów starożytnych. Już około 3500 lat temu w Egipcie

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009 454; e-mail: danuta.wojcieszynska@us.edu.p

stosowano wywar z suszonych liści mirtu jako środek przeciw bolesnym skurczom macicy. Hipokrates zalecał sok z topoli do leczenia chorób oka, a sok z wierzby do łagodzenia bólów porodowych i obniżania gorączki. W 1897 roku H o f f m a n i wsp. otrzymali oczyszczoną aspirynę, która była pozbawiona niepożądanych działań, charakterystycznych dla kwasu salicylowego i jego soli. Pod koniec lat 60-tych ubiegłego stulecia odkryto, że lek ten ma również działanie przeciwskrzepowe na skutek nieodwracalnej acetylacji seryny [24, 33].

Obecnie produkowane niesteroidowe leki przeciwzapalne są bardzo zróżnicowane pod względem chemicznym. Do najpopularniejszych zalicza się pochodne kwasu salicylowego, pochodne pirazolonu (fenazon, propyfenazon), *para*-aminofenonu (fenacetyna, paracetamol), kwasu fenylooctowego (diklofenak) i propionowego (ibuprofen, ketoprofen, naproksen) [48].

Wg danych Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, w 2004 r. w Polsce spożycie ibuprofenu przekroczyło 87,8 ton [13]. Związek ten przez wiele lat stosowany był jedynie w postaci mieszaniny racemicznej, składającej się z równych ilości dwóch form przestrzennych: enancjomeru prawoskrętnego o konfiguracji S, który hamuje cyklooksygenazę, wywołując działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne oraz enancjomeru lewoskrętnego o konfiguracji R-nieaktywnego farmakologicznie. Obecnie w wielu krajach, również w Polsce, dostępne są preparaty, zawierające tylko aktywny farmakologicznie enancjomer (+)–S. Stosowanie prawoskrętnej formy ibuprofenu pozwoliło zredukować dawkę leku, co zmniejsza ryzyko działań niepożądanych [24]. Z innych popularnych leków przeciwzapalnych na uwagę zasługuje diklofenak. Diklofenak jest unikalnym lekiem należącym do NLPZ, ponieważ hamuje również lipooksygenazę, ograniczając tym samym tworzenie leukotrienów, jednak w środowisku cechuje się wyjątkową trwałością oraz wysoka toksycznością. Spożycie tego związku w 2003 r. wynosiło ponad 21 ton [33, 48, 50].

Mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych został poznany w roku 1971, kiedy to odkryto ich hamujący wpływ na pierwszy enzym szlaku przemian kwasu arachidonowego – cyklooksygenazy (COX). Jej rola polega na utlenianiu naturalnych lipidów wchodzących w skład błon komórkowych do tzw. cyklicznych nadtlenków, które z kolei ulegają dalszym przemianom, dając trzy grupy aktywnych związków: prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanu [24, 33].

Po spożyciu niesteroidowe leki przeciwzapalne są wydalane z organizmu w postaci macierzystej lub w postaci metabolitów. Większość spożywanych farmaceutyków podlega przemianom pierwszej lub drugiej fazy biotransformacji. Faza I zwykle obejmuje reakcje utleniania, redukcji i hydrolizy a produkty tych reakcji są często bardziej aktywne i toksyczne niż forma pierwotna leku. W fazie II metabolity I fazy ulegają syntezie z kwasem glukuronowym, siarczanami i aminokwasami co prowadzi na ogół do dezaktywacji leku. Reakcje sprzęgania, wskutek podwyższenia rozpuszczalności w wodzie, umożliwiają eliminację leku przez nerki oraz z żółcią. Reakcje zarówno fazy I i II mogą zmienić fizykochemiczne właściwości leku stąd losy metabolitów w środowisku mogą być zupełnie inne – metabolity mają właściwości polarne i wykazują większą rozpuszczalność w wodzie niż leki macierzyste. Ponadto formy sprzężone mogą ulec w środowisku hydrolizie i wrócić do formy macierzystej leku [12, 17, 19, 34, 39, 49].

Ze względu na to, że leki są stale wprowadzane do ekosystemów wodnych (w postaci niezmienionej lub jako aktywne metabolity) nawet w małych stężeniach, to ich pozostałości mogą ulegać kumulacji w organizmach żywych, a tym samym negatywnie oddziaływać na wiele pokoleń. NLPZ nie stwarzają raczej ryzyka wystąpienia ostrej toksyczności u organizmów wodnych, natomiast dane dotyczące skutków ich długotrwałego narażenia na subtoksyczne stężenia są niepełne, a niekiedy sprzeczne [4, 11, 17].

3. Degradacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych metodami fizyko-chemicznymi

Obecnie metodami pozwalającymi na trwałe usuwania NLPZ występujących w wodach powierzchniowych i w ściekach są procesy fotokatalitycznego utleniania (fotodegradacji), chlorynacji, chloraminacji i ozonowania [12, 42, 53, 57]. Metody zaawansowanego utleniania przebiegają najczęściej przy udziale promieniowania UV lub światła słonecznego i w obecności półprzewodników (fotokatalizatorów). Najprawdopodobniej mechanizm tego procesu jest wolnorodnikowy i polega na generowaniu wysoce reaktywnych, a przy tym mało selektywnych rodników hydroksylowych (HO·), należących do jednych z najsilniejszych utleniaczy. Jako katalizatory powszechnie stosuje się tlenki metali, np. TiO_2, ZnO, SnO_2, oraz siarczki, np. ZnS, CdS. Spośród badanych półprzewodników największe zastosowanie ma TiO_2 [46].

P a c k e r i wsp. [37] badali proces degradacji naproksenu, diklofenaku i ibuprofenu w rzece Missisippi pod wpływem światła słonecznego. Okres półtrwania naproksenu w tych warunkach wynosił 42 minuty [P a c k e r i wsp. [37]. Zdecydowanie bardziej fotolabilnym NLPZ okazał się ketoprofen, którego okres półtrwania w rzece Besòs wynosił 2,4 minuty. W początkowym etapie reakcji dochodziło do dekarboksylacji. Powstały (3-etylofenylo)(fenylo)metanon reagował z tlenem i rodnikiem hydroksylowym, w wyniku czego powstawał (3-(1-hydroskyetylo)fenylo)(fenylo)metanon. Związek ten ulegał następnie demetylacji z równoczesnym rozszczepieniem pierścienia aromatycznego. W wyniku tych przemian powstawał 1-fenyloetanon [32].

M a r o t t a i wsp. [31] przeprowadzili fotodegradację naproksenu z wykorzystaniem lampy emitującej monochromatyczne światło o długości fali 254 nm. Po 30 minutach naświetlania stwierdzono całkowitą degradację 10^{-5} M naproksenu i obserwowano pojawienie się intermediatów: 1-(6-metoksy-2-naftylo)etanolu lub 2-acetylo-6-metoksynaftalenu.

B u s e r i wsp. [6] wykorzystali metody fotokatalitycznego utleniania podczas usuwania diklofenaku z jeziora Greifensee w Szwajcarii. Wydajność tego procesu oszacowano na 90%. Jednakże proces eliminacji diklofenaku w procesie fotodegradacji może ulec zaburzeniu w obecności jonów azotanowych i kwasów humusowych [5]. Zwiększenie wydajności fotokatalitycznego procesu utleniania diklofenaku można osiągnąć poprzez zastosowanie dwutlenku tytanu jako katalizatora. W układzie takim reakcja zachodzi najintensywniej w ciągu 20–40 minut od rozpoczęcia reakcji, kiedy to obserwuje się około 60% ubytek z 50 mg/l wprowadzonego substratu. Reakcja fotooksydacji inicjowana jest poprzez rodnik hydroksylowy, tlen singletowy oraz anionorodnik ponadtlenkowy. Pierwszym produktem fototransformacji diklofenaku jest kwas (8-chloro-9H-karbazolo-1-yl)octowy. Prawdopodobnie w mechanizmie reakcji rodnik hydroksylowy odpowiada za fotokatalityczne usunięcie atomu chloru. Wykazano, że reakcje katalizowane w obecności TiO_2 są silnie zależne od pH środowiska [10].

Pierwszym etapem degradacji paracetamolu w układzie UV/TiO_2 jest atak rodnika hydroksylowego na resztę acetamidową i przekształcenie jej do amidu kwasu szczawiowego. W wyniku tych reakcji powstają hydrochinon i benzochinon, które następnie pod wpływem rodników hydroksylowych przekształcane są do hydroksylowanych produktów [1]. T r o v o i wsp. [52] wykazali, że na proces fotokatalitycznej degradacji wpływa obecność tlenków żelaza. Prawdopodobnie zwiększona wydajność farmaceutyków w układzie z FeOx związana jest z wysoką kwantową wydajnością tworzenia Fe(II) oraz tworzenia wolnych rodników podczas fotolizy.

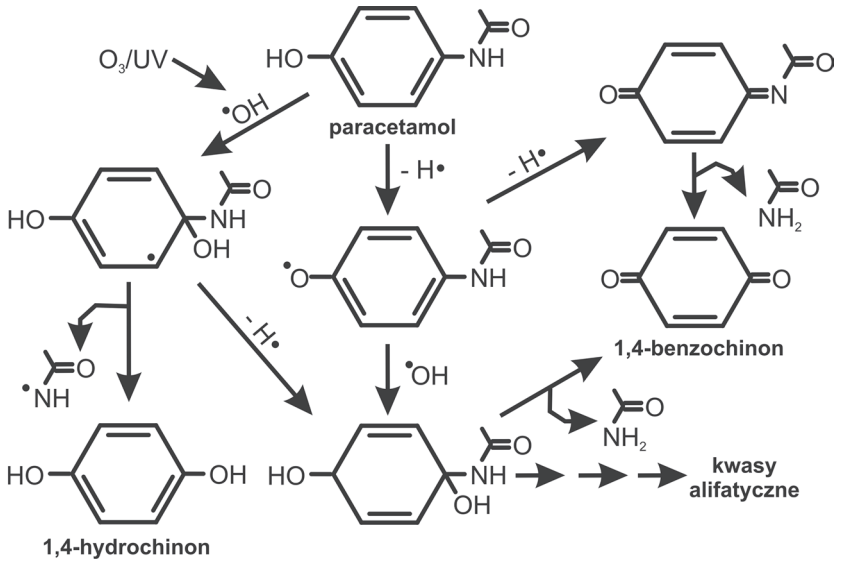
Fototransformacja ibuprofenu prowadzi do skracania łańcuchów bocznych. Zaobserwowano jednak, że reakcje zachodzą intensywniej w łańcuchu propanowym niż izobutylowym ibuprofenu [54]. R u g g e r i i wsp. [45] wykazali, iż w środowisku wodnym może dochodzić do tworzenia toksycznej pochodnej ibuprofenu – 4-izobutyloacetofenonu na drodze trzech fotochemicznych przemian: bezpośredniej fotolizy, reakcji z rodnikami hydroksylowymi oraz reakcji z rozpuszczalną chromoforową materią organiczną w tripletowym stanie. W Polsce badania nad fotokatalityczną degradacją ibuprofenu i kwasu mefenamowego prowadzono w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, w wyniku których wykazano całkowitą degradację tych leków metodą fotokatalitycznego utlenienia w obecności TiO_2 jako fotokatalizatora, w ściekach komunalnych [46].

Ze względu na wysoki potencjał oksydacyjny ozonu, ozonowanie znalazło zastosowanie w procesach oczyszczania wód z NLPZ. W procesie tym ozon wprowadzany jest do wody w postaci gazowej, gdzie dochodzi do reakcji pomiędzy nim a materią organiczną [15, 35]. Następnie dekompozycja ozonu do rodnika hydroksylowego prowadzi do dalszego utleniania związków rozpuszczonych w wodzie [15]. N e a m t u i wsp. [35] zaobserwowali 51% degradację paracetamolu po zastosowaniu ozonowania, jednakże stwierdzili oni, iż w tym procesie może dochodzić do niecałkowitego utleniania NLPZ i w konsekwencji do powstawania wysoce toksycznych półproduktów. Ponadto w obecności jonów bromkowych podczas ozonowania może dochodzić do tworzenia kancerogennych pochodnych [35, 56].

W celu zwiększenia wydajności degradacji paracetamolu w procesie ozonowania zastosowano promieniowanie UV [20, 58]. Po zastosowaniu tak skonstruowanego układu zaobserwowano pojawianie się 2-hydroksychinonu, acetamidu, benzochinonu i kwasów alifatycznych jako produktów rozkładu paracetamolu (Rys. 1) [35]. Po zastosowaniu ozonowania w obecności dwutlenku tytanu jako katalizatora obserwowano 62% degradację naproksenu [44]. Jednak pomimo dużej efektywności degradacji NLPZ metodami zaawansowanego utleniania procesy te cechują się małą specyficznością, dużymi kosztami jak również mogą być przyczyną niekontrolowanych reakcji rodnikowych w środowisku. Zwykle metody mikrobiologicznej degradacji są bezpieczniejsze i tańsze, jednak problemem jest pozyskanie szczepów mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych [58].

4. Szlaki biologicznej degradacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Alternatywą dla procesów fizyko-chemicznego oczyszczania wód z NLPZ jest bioremediacja ze względu na niższe koszty i mineralizację NLPZ do nietoksycznych produktów [2]. Jednak według testów biodegradacyjnych zalecanych przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) jedynie paracetamol i pochodne kwasu salicylowego są uznane jako związki biodegradowalne przez osad czynny. Ze względu na niską biodegradowalność NLPZ od kilku lat prowadzone są b)adania nad intensyfikacją procesów degradacyjnych z udziałem osadu czynnego. Częściowym sukcesem zakończyły się badania Q u i n t a n a i wsp. [40] nad rozkładem ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku przez osad czynny. Degradacja ketoprofenu prowadziła do dwóch metabolitów: kwasu 3-(hydroksykarboksymetylo)-hydratopowego



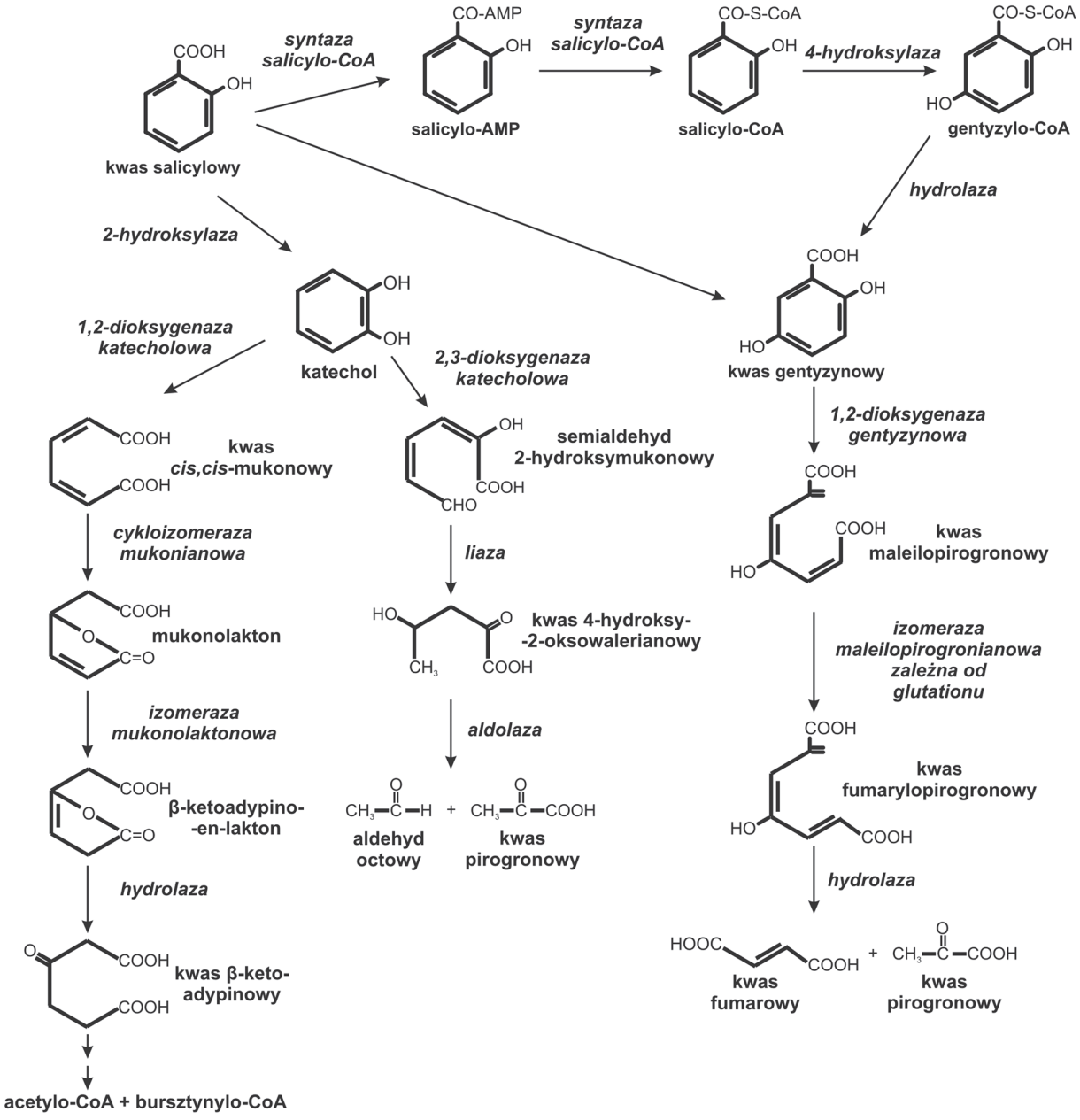
Rys. 1. Degradacja paracetamolu metodą O_3/UV [20, 35]

oraz kwasu 3-(ketokarboksymetylo)-hydratopowego. Identyfikacja tych produktów była podstawą do zaproponowania przez nich szlaku degradacji tego związku. Prawdopodobnie powstałe kwasy ulegają kolejnym przemianom prowadzącym do całkowitej mineralizacji. Zaproponowano drogę rozkładu ketoprofenu wspólnym szlakiem degradacji bifenyli, ich eterów i innych pochodnych bifenyli. Pierwszym etapem degradacji tego związku jest redukcja grupy ketonowej do hydroksylowej. W wyniku redukcji grupy ketonowej do grupy hydroksylowej otrzymany produkt charakteryzuje się większa gęstością elektronową i jest bardziej podatny na elektrofilowy atak tlenu podczas następnego etapu – dioksygenacji, w wyniku której powstaje związek z ugrupowaniem katecholowym umożliwiającym atak dioksygenaz rozszczepiających. W wyniku *meta* rozszczepienia powstaje pochodna semialdehydu hydroksymukonowego. W dalszym etapie intermediat ten ulega hydrolizie, w wyniku której powstaje kwas α-hydroksypentadienowy oraz kwas 3-(hydroksykarboksymetylo)hydratopowy, którego drugorzędowa grupa hydroksylowa ulega utlenieniu, w wyniku czego powstaje kwas 3-(ketokarboksymetylo)-hydratopowy [40]. Ponadto Quintana i wsp. [40] i Kosjek i wsp. [27] obserwowali transformację ibuprofenu do dwóch izomerów hydroksyibuprofenu oraz demetylację naproksenu.

Kosjek i wsp. [26,27] zidentyfikowali metabolity transformacji diklofenaku przez czynny. Zaobserwowali, że pierwszy etap degradacji diklofenaku prowadził do utworzenia hydroksyl- i metoksypochodnej diklofenaku. W dalszym etapie następowała dehydratacja i przekształcenie w laktam: 1-(2,6-dichlorofenylo)-1,3-dihydro-2H-indolo-2-on. Analiza produktu z wykorzystaniem LC-MS wykazała obecność dwóch metabolitów o wzorze sumarycznym $C_{13}H_{10}NCl_2$. Zaproponowano, że są to formy izomeryczne 2,6-dichloro-N-(fenylo)aniliny [26].

Na procesy degradacji NLPZ przez osad czynny wpływa jego wiek [57]. W bioreaktorze przepływowym z 200-dniowym osadem czynnym obserwowano całkowitą degradację paracetamolu i ibuprofenu oraz 79–96% degradację ketoprofenu i naproksenu. Pomimo wykorzystania metody osadu czynnego w oczyszczaniu ścieków z NLPZ, leki te są wykrywane na wypływach z oczyszczalni [14, 41, 49]. Z tego względu w ostatnich latach zwraca się uwagę na integrację metod chemicznego i biologicznego utleniania związków toksycznych. Coelho i wsp. [9] podjęli próbę podwyższenia biodegradowalności diklofenaku przez osad czynny poprzez wcześniejsze ozonowanie. Wykazali, że godzinne ozonowanie powodowało zwiększoną podatność intermediatów na procesy biologicznego utleniania. Równocześnie nie stwierdzono negatywnego wpływu ozonowania na funkcjonowanie osadu czynnego. Być może integracja biologicznego i chemicznego utleniania NLPZ jest alternatywą dla klasycznych metod oczyszczania ścieków.

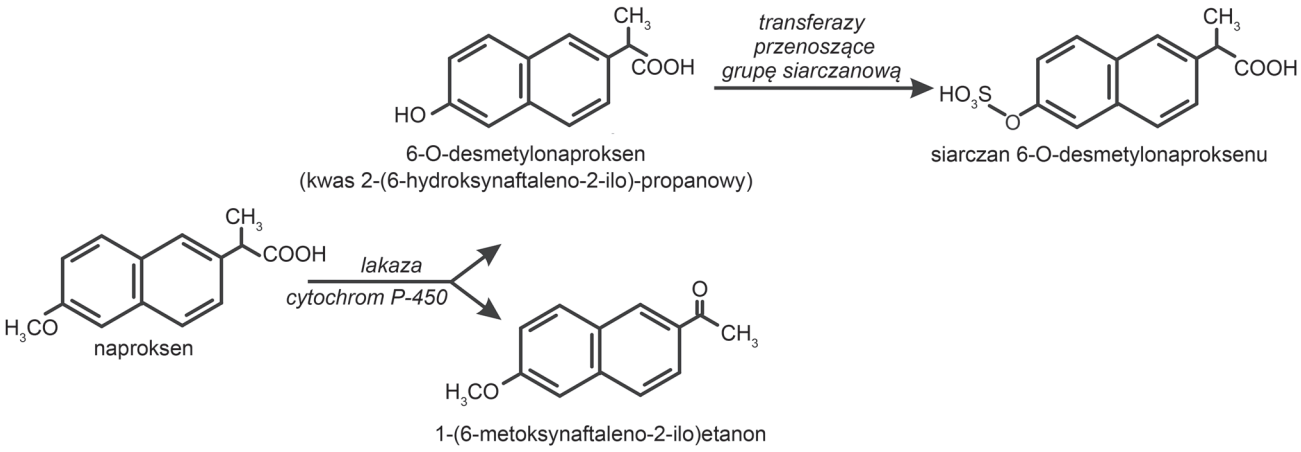
W celu zoptymalizowania procesów biodegradacji dąży się do pozyskania metodami racjonalnego skriningu mikroorganizmów o zwiększonych zdolnościach degradacyjnych oraz opisania dróg metabolicznych rozkładu NLPZ. Najlepiej poznano i opisano drogi rozkładu salicylanów ze względu na ich naturalne pochodzenie. W roku 1972 Chakrabarty [7] opisał genetyczne podstawy procesu biodegradacji salicylanów przez szczep *Pseudomonas putida* R1. Salicylany mogą być rozkładane poprzez dwa kluczowe metabolity: katechol oraz kwas gentyzynowy. Powstały w wyniku hydroksylacji salicylanów katechol ulega rozszczepieniu drogą *orto* lub *meta*. Za pierwszy etap rozkładu szlakiem *orto* odpowiada 1,2-dioksygenaza katecholowa, która utlenia katechol do kwasu *cis,cis*-mukonowego. W dalszym etapie dochodzi do laktonizacji pierścienia, a następnie izomeryzacji. Powstały lakton kwasu β-ketoadypinowego



Rys. 2. Mikrobiologiczna degradacja salicylanu [21, 22, 23, 60]

ulega hydrolizie do kwasu β-ketoadypinowego, który jest włączany do centralnego metabolizmu, w wyniku czego uzyskuje się końcowe produkty: kwas bursztynowy i acetylo-CoA. W szlaku *meta* katechol ulega rozszczepieniu z udziałem 2,3-dioksygenazy do semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Intermediat ten ulega następnie lizie do kwasu 4-hydroksy-2-ketowalerianowego, który następnie ulega rozszczepieniu do acetaldehydu kwasu pirogronowego [7, 47]. Rozkład salicylanu poprzez gentyzynian rozpoczyna się hydroksylacją z udziałem 4-hydroksylazy. Powstały kwas gentyzynowy ulega rozszczepieniu z udziałem 1,2-dioksygenazy gentyzynowej do maleilopirogronianu, który podlega następnie redukcji z udziałem izomerazy maleilopirogronianu zależnej od glutationu. Powstały fumarylopirogronian hydrolizuje do pirogronianu i fumaranu [38, 60]. I s h i y a m a i wsp. [21] opisali szlak rozkładu salicylanów przez szczep *Streptomyces* sp. WA46. W pierwszym etapie tego szlaku dochodzi do konwersji salicylanu do salicylo-CoA poprzez salicylo--AMP jako intermediat. Salicylo-CoA ulega następnie utlenieniu do gentyzylo-CoA. W wyniku hydrolizy CoA powstaje gentyzynian, którego rozkład przebiega opisanym powyżej szlakiem kwasu gentyzynowego [21]. Szlaki mikrobiologicznej degradacji salicylanów przedstawiono na rysunku 2.

Rozkład salicylanów obserwowano również przez grzyby *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora* i drożdże. Przebiega on podobnie jak u bakterii poprzez katechol lub kwas gentyzynowy. Jednak istnieją również szczepy



Rys. 3. Mikrobiologiczna degradacja naproksenu [29, 43]

grzybów cechujące się odmiennym metabolizmem salicylanów. Grzyb *Neurospora crassa* redukuje salicylany do saligenin [38]. Natomiast *Trichosporon moniliiforme* inicjuje rozkład salicylanu dekarboksylacją do fenolu. Ulega on następnie utlenieniu do katecholu i rozszczepieniu *orto* do kwasu *cis,cis*-mukonowego [23].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne będące pochodnymi kwasu antranilowego, heterocykliczne i arylowe pochodne kwasu octowego lub kwasu propionowego oraz pochodne kwasów enolowych są trudno degradowalne ze względu na ich strukturę. Dotychczas opisano jedynie kilka mikroorganizmów, głównie grzybów (*Penicillium*, *Trametes versicolor*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakeslesna*, *Beauveria bassiana, Phanerochaete chrysosporium*, *P. sordida*, *Actinoplanes* sp., *Bjerkandera* sp. R1, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum*), zdolnych do ich transformacji bądź degradacji [17, 18, 28, 30, 41, 42]. W 1975 roku H a r t i O r r [18] opisali szczep *Penicillium* metabolizujący paracetamol do octanu i 4-aminofenolu, jednak ten ostatni nie ulegał dalszej degradacji.

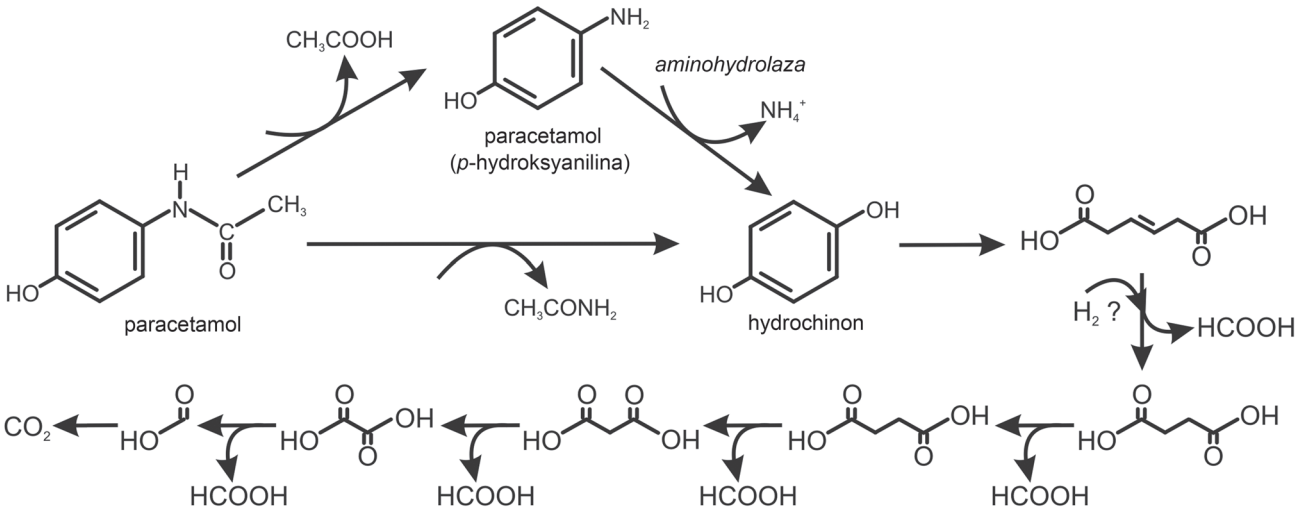
M a r c o - U r r e a i wsp. [30] opisali rozkład ketoprofenu przez grzyby *Trametes versicolor*. W pierwszy etap transformacji zaangażowane są prawdopodobnie monooksygenazy cytochromu P450. Głównym produktem hydroksylacji jest kwas 2-[(3-hydroksy(fenylo) metylo)fenylo]-propanowy, w mniejszych stężeniach powstaje kwas 2-[3-(4-hydroksybenzoilo)fenylo]-propanowy oraz kwas 2-(3-benzoilo-4-hydroksyfenylo]--propanowy. Prawdopodobnie powstałe kwasy ulegają kolejnym przemianom prowadzącym do całkowitej mineralizacji. Uważa się, iż monooksygenaza cytochromu P450 wraz z lakazą są zaangażowane w transformację naproksenu do kwasu 2-(6-hydroksynaftaleno-2-ilo)--propanowego oraz 1-(6-metoksynaftaleno-2-ilo)-etanonu (Rys. 3) [29, 43]. L l o r e t i wsp. [28] wykorzystali komercyjną laktazę izolowaną z *Myceliophthora thermophila* w degradacji diklofenaku i naproksenu uzyskując 100% rozkład diklofenaku. Uzyskanie identycznej wydajności podczas rozkładu naproksenu wymagało zastosowania mediatora redoks [28].

R o d a r t e - M o r a l e s i wsp. [41] badali degradację diklofenaku, naproksenu i ibuprofenu z udziałem grzybów białej zgnilizny: *Bjerkandera* sp. R1, *B. adusta* i *Phanerochaete chrysosporium*. Grzyby *P. chrysosporium* przeprowadzały całkowitą degradację naproksenu, natomiast diklofenak rozkładany był przez *Bjerkandera* sp. R1, *P. chrysosporium* i *B. adusta* z wydajnością wynoszącą odpowiednio 99%, 77% i 9%. Ibuprofen rozkładany był przez wszystkie badane grzyby z wydajnością ponad 70% [41, 42].

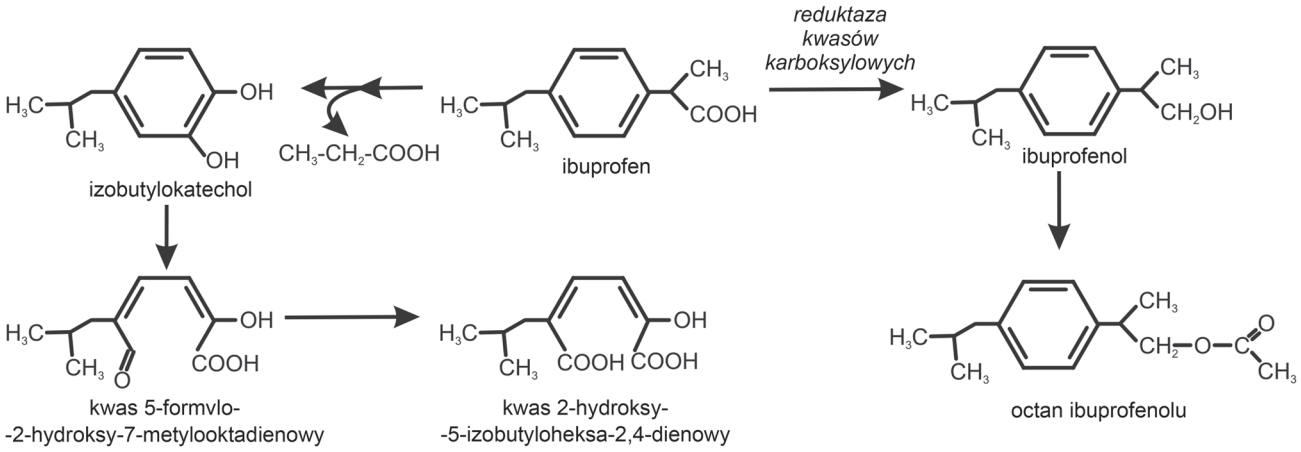
Do nielicznych bakterii rozkładających NLPZ należą szczepy z rodzajów *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Patulibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* [2–4, 8, 16, 22, 34, 55, 58]. Do tej pory nie opisano degradacji naproksenu i diklofenaku przez izolowane szczepy bakterii.

I v s h i n a i wsp. [22] opisali degradację paracetamolu przez bakterie z rodzaju *Rhodococcus* drogą poprzez *para*-aminofenol, pirokatechol i hydrochinon. Po 20-dniach obserwowano całkowitą degradację tego leku. Innymi szczepami rozkładającymi paracetamol są *Stenotrophomonas* sp. f1, *Pseudomonas* sp. f2 i fg-2, *Pseudomonas* sp. STI i *P. aeruginosa* [2, 16, 58]. Podczas degradacji z udziałem tych szczepów, w pierwszym etapie dochodzi do uwolnienia octanu i powstania aminofenolu. Proces ten zachodzi z udziałem aminohydrolazy. Grupa aminowa powstałego aminofenolu ulega podstawieniu grupą hydroksylową z utworzeniem hydrochinonu. Następnie pierścień aromatyczny ulega rozszczepieniu do karboksykwasów: 2-heksenowego, bursztynowego, malonowego, szczawiowego i mrówko wego natomiast wolna grupa aminowa ulega utlenieniu do azotanów (III), a następnie azotanów (V) (Rys. 4) [58].

Do nielicznych bakterii rozkładających ibuprofen należą szczepy *Shingomonas* sp. Ibu-2, *Patulibacter* I11 i *Nocardia* sp. NRRL 5646, jednak niewiele wiadomo o biochemii rozkładu tego związku [3, 8, 34]. *Nocardia*



Rys. 4. Mikrobiologiczna degradacja paracetamolu [58]



Rys. 5. Mikrobiologiczna degradacja ibuprofenu [8, 34]

sp. NRRL 5646 redukuje karboksylową grupę funkcyjną ibuprofenu do grupy alkoholowej. Powstała grupa hydroksylowa jest następnie estryfikowana z wytworzeniem octanu ibuprofenolu (Rys. 5) [8].

W pierwszym etapie rozkładu ibuprofenu przez szczep *Shingomonas* sp. Ibu-2 następuje odszczepienie łańcucha propionowego z równoczesną dioksygenacją w pozycji 1,2, w wyniku czego powstaje izobutylokatechol. Intermediat ten ulega *meta*-rozszczepieniu, a powstały kwas 5-formylo-2-hydroksy-7-metylooktadienowy jest utleniany do kwasu 2-hydroksy-5-izobutyloheksa-2,4-dienowego (Rys. 5) [34].

5. Podsumowanie

Przedstawiony przegląd wskazuje, że pomimo licznych prób biodegradacji NLPZ z zastosowaniem mikroorganizmów, problem tych związków w środowisku nadal jest nierozwiązany. Jest to tym bardziej niepokojące, że problem ten będzie narastać ze względu na wzrost populacji ludzkiej i coraz większe zużycie tych leków a z drugiej na brak skutecznych metod ich degradacji. Być może rozwiązaniem byłoby zastosowanie zintegrowanych procesów chemicznego i biologicznego utleniania. Obecnie metody te znalazły zastosowanie w intensyfikacji procesów rozkładu szczególnie trwałych związków jak np. kwas pikrynowy. Jedną z najpopularniejszych metod stosowanych w zintegrowanych procesach utleniania jest ozonowanie, w wyniku którego powstają hydroksylowe pochodne podatne na działanie enzymów degradacyjnych. Ze względu na wysoką wydajność zintegrowanych systemów chemicznego i biologicznego utlenienia oraz ich stosunkowo niski koszt wydaje się, że procesy te mogą znaleźć zastosowanie w technologiach oczyszczania środowisk z NLPZ na szerszą skalę.

Piśmiennictwo

1. Aguilar C.A., Montalvo C., Ceron J.G., Moctezuma E.,: Photocatalytic degradation of acetaminophen. *Int. J. Environ. Res.* **5**, 1071–1078 (2011)

2. Ahmed S., Javed M.A., Tanvir S., Hameed A.: Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation,* **12**, 303–309 (2001)
3. Almeida B., Kjeldal H., Lolas I., Knudsen A.D., Carvalho G., Nielsen K.L., Barreto Crespo M.T., Stensballe A., Nielsen J.L.: Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation,* **24**, 615–630 (2013)
4. Almeida B., Oehmen A., Marques R., Brito D., Carvalho G., Barreto Crespo M.T.: Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Biores. Technol.* **133**, 31–37 (2013)
5. Andreozzi R., Faffaele M., Nicklas P.: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere,* **50**, 1319–1330 (2003)
6. Buser H.R., Poiger T., Müller M.D.: Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol*. **32**, 3449–3456 (1998)
7. Chakrabarty A.M.: Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas. *J. Bacteriol.* **112**, 815–823 (1972)
8. Chen Y., Rosazza J.P.N.: Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species. *Appl. Environ. Microbiol*. **60**, 1292–1296 (1994)
9. Coelho A.D., Sans C., Agűera A., Gómez M.J., Esplugas S., Dezotti M.: Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: intermediates, biodegradability and toxicity assessment. *Sci. Total Environ*. **407**, 3572–3578 (2009)
10. Czech B., Rubinowska K.: TiO_2-assisted photocatalytic degradation of diclofenac, metoprol, estrone and chloramphenicol as endocrine disruptors in water. *Adsorption*, **19**, 619–630 (2013)
11. Epold I., Dulova N., Trapido M.: Degradation of diclofenac in aqueous solution by homogeneous and heterogeneous photolysis. *J. Environ. Eng. Ecol. Sci.*, DOI http://dx.doi.org/10.7243/2050-1323-1-3 (2012)
12. Escher B.I., Fenner K.: Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environ. Sci. Technol*. **45**, 3835–3847 (2011)
13. Felis E., Miksch K.: Removal of analgesic drugs from the aquatic environment using photochemical methods. *Water Sci. Technol.* **60**, 2253–2259 (2009)
14. Ferrando-Climent L., Collado N., Buttiglieri G., Gros M., Rodriguez-Roda I., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D.: Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci. Total Environ*. **438**, 404–413 (2012)
15. Gromadzka K., Nawrocki J.: Degradation of diclofenac and clofibric acid using ozone-loaded perfluorinated solvent. *Ozone Sci. Eng.* **28**, 85–94 (2006)
16. Gusseme B.D., Vanhaecke L., Verstraete W., Boon N.: Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Res.* **45**, 1829–1837 (2011)
17. Guzik U., Hupert-Kocurek K., Mazur A., Wojcieszyńska D.: Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku. *Bromat. Chem. Toksykol.* **46**, 105–112 (2013)
18. Hart A., Orr D.L.J.: The degradation of paracetamol (4-hydroxyacetanilide) and other substituted acetanilides by a *Penicillium* species. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **41**, 239–247 (1975)
19. Hashim N.H., Nghiem L.D., Stuetz R.M., Khan S.J.: Enantiospecific fate of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in a laboratory-scale membrane bioreactor. *Water Res.* **45**, 6249–6258 (2011)
20. Illes E., Takacs E., Dombi A., Gajda-Schrantz K., Racz G., Gonter K., Wojnarovits L.: Hydroxyl radical induced degradation of ibuprofen. *Sci. Total Environ*. **447**, 286–292 (2013)
21. Ishiyama D., Vujaklija D., Davies J.: Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1297–1306 (2004)
22. Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I.: Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic *Rhodococci*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 392–395 (2006)
23. Iwasaki Y., Gunji H., Kino K. Hattori T., Ishii Y., Kirimura K.: Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation *via* phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme*. *Biodegradation*, **21**, 557–564 (2010)
24. Karaźniewicz M.: Czterdzieści lat doświadczeń stosowania ibuprofenu w lecznictwie. *Now. Lek*. **76**, 195–197 (2007)
25. Kosjek T., Heath E., Kompare B.: Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1379–1387 (2007)
26. Kosjek T., Heath E., Pérez S., Petrović M., Barceló D.: Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Hydrol.* **372**, 109–117 (2009)
27. Kosjek T., Heath E., Petrović M., Barceló D.: Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends Anal. Chem.* **26**, 1076–1085 (2007)
28. Lloret L., Eibes G., Lu-Chau T.A., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M.: Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochem. Eng. J.* **51**, 124–131 (2010)
29. Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Blanquez P., Vicent T., Caminal G.: Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC--DAD-MS and NMR. *Biores. Technol.* **101**, 2159–2166 (2010)
30. Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Cruz-Morato C., Caminal G., Vicent T.: White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere*, **78**, 474–481 (2010)
31. Marotta R., Spasiano D., Somma I.D., Andreozzi R.: Photodegradation of naproxen and its photoproducts in aqueous solution at 254 nm: a kinetic investigation. *Water Res.* **47**, 373–383 (2013)
32. Matamoros V., Duhec A., Albaigés J., Bayona J.M.: Photodegradation of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and 17α-ethinylestradiol in fresh and seawater. *Water Air Soil Pollut.* **196**, 161–168 (2009)
33. Międzybrodzki R.: Kierunki poszukiwań i zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. *Post. Hig. Med. Dośw*. **58**, 438–448 (2004).
34. Murdoch R.W., Hay A.G.: Formation of catechols *via* removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6121–6125 (2005)
35. Neamtu M., Bobu M., Kettrup A., Siminiceanu I.: Ozone photolysis of paracetamol in aqueous solution. *J. Environ. Sci. Health A*, **48**, 1264–1271 (2013)
36. Nikolaou A., Meric S., Fatta D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1225–1234 (2007)
37. Packer J.L., Werner J.J., Latch D.E., McNeill K., Arnold W.A.: Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* **65**, 342–351 (2003)
38. Penn C.D., Daniel S.L.: Salicylate degradation by the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* **67**, 218–225 (2013)
39. Perez S., Barcelo D.: First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT-MS and QqTOF-MS. *Anal. Chem.* **80**, 8135–8145 (2008)

40. Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T.: Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* **39**, 2654–2664 (2005)
41. Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M.: Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation*, **23**, 145–156 (2012)
42. Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M.: Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1839–1849 (2011)
43. Rodriguez-Rodriguez C.E., Marco-Urrea E., Caminal G.: Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes. *J. Hazard. Mater.* **179**, 1152–1155 (2010)
44. Rosal R., Rodriguez A., Gonzalo M.S., Garcia-Calvo E.: Catalytic ozonation of naproxen and carbamazepine on titanium dioxide. *Appl. Catal. B-Environ.* **84**, 48–57 (2008)
45. Ruggeri G., Ghigo G., Maurino V., Minero C., Vione D.: Photochemical transformation of ibuprofen into harmful 4-isobutylacetophenone: pathways, kinetics, and significance for surface waters. *Water Res.* **47**, 6109–6121 (2013)
46. Rzepa J.: Oznaczanie leków i pestycydów w wodach powierzchniowych (w) Postępy Chromatografii, red. B.K. Głód, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce, 2009, s. 67
47. Silva T.R., Valdman E., Valdman B., Leite S.G.F.: Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44: parameters studies and application tools. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 39–44 (2007)
48. Sosnowska K., Styszko-Grochowiak K., Gołaś J.: Leki w środowisku – źródła, przemiany, zagrożenia. Krakowska Konferencja Młodych Uczonych 2009
49. Stülten D., Zühlke S., Lamshöft M., Spiteller M.: Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci. Total Environ.* **405**, 310–316 (2008)
50. Szymonik A., Lach J.: Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **15**, 249–263 (2012)
51. Ternes T.: Occurence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **32**, 3245–3260 (1998)
52. Trovó A.G., Melo S.A.S., Nogueira R.F.P.: Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process-application to sewage treatment plant effluent. *J. Photochem. Photobiol. A*, **198**, 215–220 (2008)
53. Veach A., Bernot M.J., Mitchell J.K.: The influence of six pharmaceuticals on freshwater sediment microbial growth incubated at different temperatures and UV exposures. *Biodegradation*, **23**, 497–507 (2012)
54. Vione D., Maddigapu P.R., De Laurentiis E., Minella M., Pazzi M., Maurino V., Minero C., Kouras S., Richard C.: Modelling the photochemical fate of ibuprofen in surface waters. *Water Res.* **45**, 6725–6736 (2011)
55. Wu S., Zhang L., Chen J.: Paracetamol in the environment and its degradation by microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 875–884 (2012)
56. Yu H., Nie E., Xu J., Yan S., Cooper W.J., Song W.: Degradation of diclofenac by advanced oxidation and reduction processes: kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments. *Water Res.* **47**, 1909–1918 (2013)
57. Yu T.H., Lin A.Y.Ch., Lateef S.K., Lin Ch.F., Yang P.Y.: Removal of antibiotics and non-steroidal inti-inflammatory drugs by extended sludge age biological process. *Chemosphere*, **77**, 175–181 (2009)
58. Zhang L., Hu J., Zhu R., Zhou Q., Chen J.: Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3687–3698 (2013)
59. Zhang Y., Geissen S.U., Gal C.: Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, **73**, 1151–1161 (2008)
60. Zhou N.-Y., Fuenmayor S.L., Williams P.A.: *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* **183**, 7000–7008 (2001)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 71–80
http://www.pm.microbiology.pl

GRZYBY Z RODZAJU *NEOTYPHODIUM* – ENDOFITY TRAW

Barbara Wiewióra[1]*

[1] Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Wpłynęło w lipcu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Neotyphodium*. 3. Metody identyfikacji. 4. Alkaloidy wytwarzane przez endofity. 5. Choroby zwierząt wywoływane przez alkaloidy produkowane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*. 6. Wpływ alkaloidów na odporność traw na stresy. 6.1. Stresy abiotyczne. 6.2. Stresy biotyczne. 7. Występowanie endofitów w Polsce i na świecie. 8. Podsumowanie

Grass endophytes of the *Neotyphodium* genus

Abstract: Endophytes are fungi of the genus *Neotyphodium*, that live in symbiosis with grasses. The effects of this symbiosis can be both negative and positive. The negative effect may be due to alkaloids produced by endophytes, that in higher concentrations are toxic to animals. On the other hand, the effect of symbiosis can be beneficial to plants, because the grass becomes more resistant to biotic and abiotic stresses such as drought, pests or diseases. The most common alkaloid produce by *Neotyphodium* fungi are ergovaline and lolitrem B.

Current state of knowledge on the settlement of grasses by these fungi in Poland is rather small. These fungi are usually present in the seeds of *Festuca ovina*, *F. pratensis*, *F. arundinacea* and *Lolium perenne*. Endophytes were found in plants of permanent grasslands. The most often infected plants were from: *Festuca pratensis*, *F. arundinacea*, *F. rubra*, *F. ovina* and *Lolium perenne*. Traces of endophyte presence was also found in the ecotypes of *Deschampsia caespitosa*, *F. capillata*, *F. gigantea*, *L. multiflorum*, *Poa pratensis* and *Phleum pratense*. It was observed that fungi from the genus *Neotyphodium* occurring in the pasture sward can produce alkaloids, but its production is a variable trait, even within a single ecotype. The average ergovaline content in grass from the permanent pasture in some areas exceeded the threshold level above which disease symptoms in animals may occur.

1. Introduction. 2. Characterization of fungi from *Neotyphodium* genus. 3. Identification methods. 4. Alkaloids produced by endophytes. 5. Animal diseases caused by alkaloids produced by fungi of the genus *Neotyphodium*. 6. Effect of alkaloids on grass resistance to stress. 6.1. Abiotic stresses. 6.2. Biotic stresses. 7. The occurrence of endophytes in Poland and in the world. 8. Summary

Słowa kluczowe: choroby zwierząt, endofity, ergowalina, lolitrem B, odporność na choroby
Key words: animal diseases, disease resistance, endophytes, ergovaline, lolitrem B

1. Wprowadzenie

Grzyby endofityczne to mikroorganizmy, które w części lub przez cały swój cykl życiowy są zdolne zasiedlać bezobjawowo tkanki roślin gospodarzy [83]. Żyją one przede wszystkim w przestrzeniach międzykomórkowych wegetatywnych organów traw oraz w ich nasionach. Dotychczasowe badania wskazują, że endofity mogą rozprzestrzeniać się wyłącznie z nasionami [90] (rys. 1). W roślinach traw zasiedlają najczęściej podstawę pochwy liściowej, stożki wzrostu i młode liście [46]. Śladowe ilości ich grzybni znajdywano także w blaszkach liściowych starszych liści oraz w korzeniach traw [43].

Współżycie endofitów z roślinami opiera się na trzech rodzajach zależności:

– pasożytnictwo: współżycie dwóch różnych organizmów polegające na tym, że jeden z nich jest pasożytem i pobiera pokarm od drugiego bez jakichkolwiek wzajemnych świadczeń (np. *Epichloë*),

– komensalizm: zależność pokarmowa polegająca na tym, że jeden organizm korzysta z zasobów pokarmowych drugiego, lecz nie czyni mu w ten sposób krzywdy, ale też nie przynosi korzyści (niektóre endofity),

– mutualizm: ścisłe współżycie dwóch organizmów przynoszące wzajemne korzyści. Organizmy te są ze sobą tak ściśle powiązane, że nie mogą żyć bez wzajemnej pomocy (*Neotyphodium* spp.).

Liczne badania wskazują, że grzyby endofityczne są bardzo zróżnicowane genetycznie co pozwala im zasiedlać wiele gatunków roślin, ponadto częstotliwość ich występowania jest bardzo duża [80]. Większość z nich zasiedla wewnętrzne tkanki liści, korzeni, łodyg i kory. Rozmnażają się poziomo przez zarodniki, chociaż zdarza się, przeważnie w trawach, że występują w postaci układowego zakażenia nadziemnych tkanek i rozprzestrzeniają się wtedy poprzez zakażone nasiona.

Do typowych endofitów występujących na trawach zaliczane są gatunki grzybów z rodzaju *Neotyphodium* takie jak: *N. lolii* Latch, Christensen & Samuels współżyjący z *L. perenne, N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams współżyjący z *F. arundinacea* i *N. uncinatum* Gams, Petroni & Schmidt występujący u *F. pratensis* [69]. Charakterystycznie pozwijana grzybnia wzrasta międzykomórkowo nie penetrując komórek (rys. 2). Wzrost liścia i endofita jest zsynchronizowany [17, 86], a grzyb przypuszczalnie uzyskuje substancje odżywcze,

* Autor korespondencyjny: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie; tel. 22 7334584; e-mail: b.wiewiora@ihar.edu.pl

z komórek gospodarza. Ponadto roślina stanowi dla niego schronienie i daje możliwość przenoszenia się do kolejnego pokolenia rośliny poprzez nasiona [59]. Zasiedlone ziarniaki nie posiadają widocznych objawów obecności tych grzybów [95], a grzybnia zasiedla głównie warstwę aleuronową, chociaż jej rozmieszczenie w nasionach bywa różne.

Współżycie traw z grzybami znane jest od dawna, ale wiedza o grzybach endofitycznych i ich rozprzestrzenieniu przez długi okres czasu była niewielka. W dużej mierze, wpływ na rosnące na świecie zainteresowanie grzybami endofitycznymi miało odkrycie szkodliwości traw, zasiedlonych endofitami, dla bydła [5, 28] oraz związek endofitów z odpornością traw na stresy biotyczne i abiotyczne [7, 32]. Intensywny rozwój badań nad endofitami nastąpił na początku lat 80-tych ubiegłego stulecia, głównie w Stanach Zjednoczonych, Nowej Zelandii i Australii [28, 33, 83, 90].

Efekty asocjacji traw z grzybami endofitycznymi mogą być różne, zarówno pozytywne jak i negatywne. Obecność endofitów w trawach może wpływać korzystnie na roślinę wzbudzając np. mechanizmy tolerancji na suszę oraz regeneracji uszkodzeń po długotrwałej suszy, jak również wpływając na oszczędną gospodarkę azotem czy lepszą przyswajalność fosforu [55]. Poza tym trawy zasiedlone przez endofity są odporne na szkodniki, nicienie oraz niektóre choroby [83]. Z drugiej strony rośliny, w których znajdują się te grzyby mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt roślinożernych. Stwierdzono, że niektóre z wytwarzanych przez te grzyby alkaloidów są toksyczne, a ich nagromadzenie w paszy może wpływać na stan zdrowotny zwierząt gospodarskich. U bydła karmionego paszą zawierającą ergowalinę, czy lolitrem B, może nastąpić spadek produkcji mleka, obniżenie wagi ciała, zmniejszenie aktywności (zwierzęta są osowiałe i unikają słońca). W skrajnych przypadkach może wystąpić tzw. kołowacizna rajgrasowa (ryegrass staggers syndrome) wywoływana obecnością lolitremu, czy też można zaobserwować objawy neurotoksyczności (fescue toxicosis) powodowanej przez nagromadzenie ergowaliny i jej pochodnych [83].

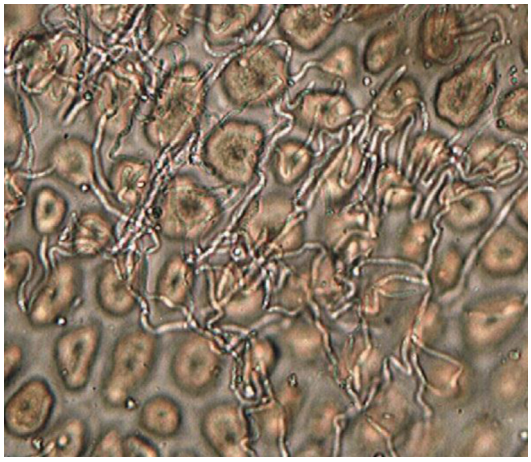
Dotychczasowe, nieliczne badania nad endofitami w Polsce wskazują, że grzyby z rodzaju *Neotyphodium* zasiedlają nasiona polskich odmian traw [62, 63]. Występowanie tych grzybów stwierdzano także w roślinach pochodzących z polskich użytków zielonych (frekwencja na poziomie 20–60%) [52, 66]. Jednak brak jest kompleksowej wiedzy o obecności endofitów zarówno w nasionach odmian traw, jak i w roślinach na trwałych użytkach zielonych w kraju. Nie wiadomo również, czy możliwe jest nagromadzenie szkodliwych alkaloidów w roślinach na pastwiskach w stopniu powodującym zagrożenie dla zdrowia zwierząt. Także w hodowli traw nie zwraca się uwagi na endofity, chociaż w procesach hodowli ekotypy stosowane są jako materiały wyjściowe. Dane z piśmiennictwa wskazują zaś na znacznie silniejsze zasiedlenie przez endofity dzikich populacji traw, w porównaniu do pochodzących z plantacji zakładanych z użyciem nasion kwalifikowanych [30].

2. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Neotyphodium*

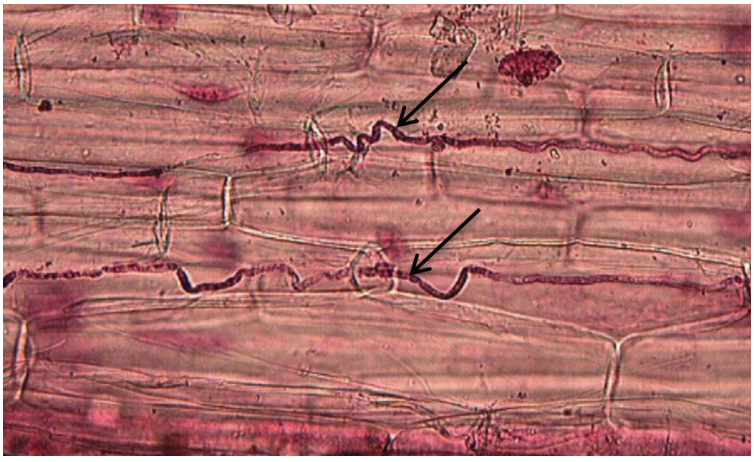
Grzyby endofityczne zasiedlające trawy należą do workowców (*Ascomycota*), rodziny *Clavicipitaceae* i są zakwalifikowane do siedmiu rodzajów: *Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Echinodothis*, *Epichloë*, *Myriogenospora* i *Parepichloë* [91, 94]. Większość gatunków należących do tych rodzajów może rozmnażać się płciowo za pomocą wytwarzanych zarodników workowych.

Grzyby endofityczne początkowo były zakwalifikowane do sekcji *Albo-lanosa* rodzaj *Acremonium* przez Morgan-Jones i Gams [58], w której umieszczono anamorficzne (niedoskonałe) stadium *Epichloë* spp., powodujące bezobjawowe porażenie traw w podrodzinie *Poaideae* [78]. Glenn i wsp. [34] przeklasyfikowali rodzaj *Acremonium* sekcji *Albo-lanosa* w nowy rodzaj *Neotyphodium* wydzielający sporyszowate grzyby *Acremonium* (e-endofity) od innych pokrewnych gatunków *Acremonium* (zwykle saprotrofów). Bazując na analizach sekwencji DNA *Acremonium coenophialum*, *A. typhinum*, *A. lolii*, *A. chisosum*, *A. starrii* i *A. uncinatum* zostały przeklasyfikowane w *Neotyphodium coenophialum*, *N. typhinum*, *N. lolii*, *N. chisosum*, *N. starrii* i *N. uncinatum*. Bezpłciowe formy endofitów – anamorfy, czyli grzyby w stadium konidialnym należące do rodzaju *Neotyphodium*, rozwijają się w dojrzewających nasionach zainfekowanego gospodarza [93], zapewniając w ten sposób pionowe rozprzestrzenianie się symbiozy na następne pokolenia roślin. Niektóre endofity z tego rodzaju posiadają stadium epifityczne, w którym grzybnia rośnie na powierzchni liści [85]. W sprzyjających warunkach z anamorfy rozwija się podkładka telemorfy (stadium doskonałe *Epichloë*), niemniej oba stadia stanowią genetyczną jedność. Anamorfa, która utraciła możliwość przejścia w stadium telemorfy staje się aseksualnym endofitem mutualistycznym. Czasami może także następować hybrydyzacja poprzez łączenie się sąsiadujących ze sobą strzępek, jednak takie hybrydy nie mogą tworzyć konidiów. Są to więc aseksualne endofity żyjące jedynie w przestrzeniach międzykomórkowych żywiciela w postaci „unieszkodliwionych pasożytów", zbudowanych z długich strzępek pozbawionych haustoriów (ssawek) [16].

U endofitów posiadających cykl płciowy (telemorfy, np. gatunki z rodzaju *Epichloë*), wektorami poziomej transmisji zarodników mogą być owady i wiatr [11] (rys. 3). W przypadku anamorf (stadium bezpłciowe) transmisja na następne pokolenie następuje jedynie za pomocą zainfekowanych nasion. Rozprzestrzenianie się tych grzybów może więc następować zarówno



Rys. 1. Grzybnia *Neotyphodium* sp. widoczna w warstwie aleuronowej ziarniaka



Rys. 2. Międzykomórkowo rosnąca charakterystyczna grzybnia

w cyklu bezpłciowym jak i płciowym, przy czym oba rodzaje rozmnażania mogą wystąpić jednocześnie na danej roślinie [97].

Większość badań na świecie poświęconych jest rozpowszechnianiu się endofitów z rodzaju *Epichloë* i *Neotyphodium* oraz zasiedlonym przez te grzyby trawom [4, 73, 79]. Najczęściej występują one u gatunków z rodzaju *Lolium* i *Festuca*, które są szczególnie ważne zarówno dla upraw pastewnych oraz trawnikowych [30, 88]. Są doniesienia o zasiedlaniu także *Bromus* spp., *Agrostis* spp., *Phleum pratense* L. i innych gatunków traw z rodzajów *Elymus*, *Anthoxanthum*, *Deschampsia*, *Koeleria*, *Holcus* występujących na naturalnych użytkach [88]. L e u c h t m a n n [49] podaje, że 290 gatunków traw jest zasiedlonych przez endofity i sugeruje, że 20–30% gatunków traw na świecie może być przez nie zasiedlonych. M á r q u e z i wsp. [56] dokładnie opisali endofity zasiedlające rośliny *Dactylis glomerata* pochodzące z 10 różnych rejonów Hiszpanii. W wielu pracach znaleźć można informacje o 100% porażeniu traw na pastwiskach [27, 70]. L e w i s [51] donosi, że w wielu europejskich krajach trawy, a w szczególności dzikie populacje *Lolium perenne*, są często zasiedlane przez grzyby endofityczne. W Polsce badania nad endofitami dotyczyły jedynie kilku odmian *L. perenne* oraz jednej odmiany *F. pratensis* [62, 63]. Uzyskane wyniki wykazały stosunkowo niskie zasiedlenie ziarniaków u odmian życicy trwałej, a dość wysokie u kostrzewy łąkowej odmiany Pasja (52%).

3. Metody identyfikacji

Grzybnia endofitów z rodzaju *Neotyphodium* zasiedla warstwę aleuronową ziarniaków oraz warstwę epidermalną dojrzałych roślin, a zakażone trawy nie wykazują zewnętrznych objawów obecności endofitów. Z tego względu metody stosowane do ich wykrywania muszą być czułe i dostosowane do cyklu rozwojowego grzyba.

Rys. 3. Stroma *Epichloë* spp. na pędach kwiatostanowych wiechliny łąkowej

Dlatego też metody diagnostyczne są oparte głównie na technikach mikroskopowych (metody barwieniowe), serologicznych (metoda immunologiczna) lub molekularnych [95].

Do wykrywania obecności grzybów z rodzaju *Neotyphodium* na trawach podaje się następujący podział stosowanych metod [69]:

a) metody bezpośrednie:
   - izolacja grzybów z pochwy liściowej lub ziarniaka,
   - badanie zawartości alkaloidów w nasionach i roślinach,
b) metody mikroskopowe:
   - barwienie różem bengalskim,
   - barwienie błękitem anilinowym,
   - metoda fluorescencyjna,
c) metody serologiczne:
   - ELISA,
   - immunologiczna,
d) metody molekularne.

Powyższe metody różnią się pracochłonnością, kosztami, efektywnością i czułością wykrywania grzybni endofitów [69, 95], ale tylko stosując metodę fluorescencyjną i metody bezpośrednie można stwierdzić obecność żywej grzybni *Neothypodium* w nasionach traw. Jednak dla oceny zasiedlenia nasion przez endofity, jedyną metodą zalecaną przez Międzynarodowy Związek Oceny Nasion – ISTA (International Seed Testing Association), jest metoda immunologiczna.

4. Alkaloidy wytwarzane przez endofity z rodzaju *Neotyphodium*

Szkodliwość grzybów endofitycznych z rodzaju *Neotyphodium* w stosunku do zwierząt roślinożernych związana jest z wytwarzaniem niebezpiecznych dla zdrowia kręgowców alkaloidów, głównie lolitremu oraz ergowaliny [52]. W niektórych krajach, np.: Nowej Zelandii i Stanach Zjednoczonych, choroby zwierząt wywoływane przez te toksyny stanowią poważny problem gospodarczy [99]. Zainteresowanie prowadzeniem badań nad endofitami w Europie jest stosunkowo niewielkie, co jest związane z rzadkim występowaniem przypadków chorób, wywoływanych przez alkaloidy produkowane przez te grzyby wśród bydła na tym terenie. Europejskie trwałe użytki zielone, istotne z punktu widzenia produkcji zwierzęcej, zawierają gatunki traw (np. *L. perenne*, *F. arundinacea*) powszechnie zasiedlane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*, a liczba gatunków traw zasiedlonych przez endofity w Europie jest większa, niż w przypadku innych kontynentów. Jednak użytki te wykazują dużą różnorodność florystyczną, co może ograniczać potencjalny negatywny wpływ endofitów na zwierzęta [98].

Znanych jest kilka rodzajów alkaloidów, które mogą być wytwarzane przez grzyby endofityczne. Są to przede wszystkim tzw. alkaloidy ergotynowe (w tym ergowalina), nasycone aminopirolopiraziny (loliny), indolditerpenoidy (lolitrem) i alkaloidy pirolopirazynowe (peramina) [20]. Alkaloidy ergotynowe znane są jako działające szkodliwie głównie na roślinożerne kręgowce, choć udokumentowany został również ich wpływ na niektóre owady [13]. Objawy zatrucia zwierząt są podobne do działania farmakologicznego tych alkaloidów (zwężenie naczyń, trudności reprodukcyjne) [67]. Lolitrem jest toksyczny dla ssaków, zwłaszcza roślinożernych pasących się na terenach bogatych w zasiedloną przez endofity życicę trwałą. Natomiast działanie peraminy w odróżnieniu do innych alkaloidów polega na odstraszaniu żerujących owadów [74].

Z danych literaturowych wynika, że karmienie bydła paszą zawierającą już 0,05 ppm ergowaliny (mg ergowaliny/kg s.m.) może istotnie wpływać na fizjologię zwierzęcia (np. wzrost temperatury ciała u bydła poddanego działaniu wysokiej temperatury powietrza w czasie upalnego lata) [22]. Progowe zawartości ergowaliny w diecie, które wywołują objawy kliniczne w USA zostały oszacowane na poziomie 0,4–0,7 ppm u bydła, 0,3–0,5 ppm u koni i 0,8–1,2 ppm u owiec. Graniczne wartości dla tego alkaloidu mogą jednak się zmieniać, ponieważ środowisko również odgrywa rolę w rozwoju klinicznych objawów choroby powodowanej przez ergowalinę [1]. Jakkolwiek już stężenie na poziomie 0,2–0,3 ppm może powodować wymierne efekty fizjologiczne tzw. toksyczność chroniczną objawiającą się np. zmniejszeniem produkcji mleka, czy zmniejszeniem masy ciała [65] i dlatego może być potencjalną przyczyną wpływającą na wydajność zwierząt gospodarskich.

Ważnymi czynnikami warunkującymi proces produkcji alkaloidów przez grzyby endofityczne, są warunki pogodowe (przede wszystkim ilość opadów atmosferycznych i temperatura powietrza) panujące na terenie, na którym występują trawy zasiedlone przez endofity [76]. Wzmożona produkcja alkaloidów przez grzyby endofityczne odbywa się, gdy roślina zasiedlona przez endofita zostaje poddana stresowi suszy [98].

W wielu krajach prowadzone są badania nad endofitami, które nie wytwarzają szkodliwych dla zwierząt alkaloidów. Przy pomocy takich wyselekcjonowanych izolatów grzyba przeprowadza się inokulację traw [45], a w wielu przypadkach proces ten jest skomercjalizowany [41, 48]. Jednocześnie w badaniach znacznym zainteresowaniem cieszą się zagadnienia związane z tym, w jaki sposób wpłynąć na endofity, aby zaprzestały wytwarzania szkodliwych alkaloidów. Badania dotyczące możliwości wyeliminowania ergowaliny z kompleksu endofit – trawa potwierdziły, że w wyniku genetycznych modyfikacji endofita można spowodować zahamowanie produkcji tego alkaloidu [60]. Następuje to poprzez oddziaływanie na geny warunkujące wytwarzanie syntetazy peptydowej niezbędnej do produkcji ergowaliny.

5. Choroby zwierząt wywoływane przez alkaloidy produkowane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*

Znane są dwie groźne choroby u bydła, których czynnikiem sprawczym są alkaloidy wytwarzane przez endofity współżyjące z trawami na pastwiskach: "ryegrass staggers syndrome" i "fescue toxicosis" [83]. Do tej pory zidentyfikowano kilka alkaloidów odpowiedzialnych za słaby rozwój zwierząt pasących się lub karmionych trawami zasiedlonymi przez endofity [68]. Należą do nich alkaloidy sporyszowe (klawiny, kwas lizergowy i jego amidy, ergopeptyny), które są odpowiedzialne za "fescue toxicosis" u zwierząt hodowlanych. Są one produkowane przez endofity zasiedlające kostrzewę trzcinową i życicę trwałą, odpowiednio *N. coenophialum* i *N. lolli*. Objawami ich działania u zwierząt może być zmniejszone pobieranie paszy, mniejszy przyrost masy

ciała, obniżona produkcja mleka, wzrost temperatury ciała, wzmożone pocenie się i ślinienie czy obniżenie wydajności reprodukcyjnej [23]. Oprócz alkaloidów sporyszowych w roślinach życicy po raz pierwszy zidentyfikowano także lolitrem (diterpeny indolu, paxilina, paxitriole, lolitriol) i jego obecność powiązano z neurotoksycznością u zwierząt zwaną jako "ryegrass staggers" [55]. Choroba objawia się spadkiem produkcji mleka, zaburzeniami ze strony układu nerwowego (m.in.: porażenie tylnych kończyn, spazmy) [57]. Ponadto stwierdzono, że w zasiedlonych przez endofity roślinach życicy, kostrzewy trzcinowej i innych gatunków traw ma miejsce produkcja innego związku pirolopirazynowego – alkaloidu peraminy [82]. Peramina posiada właściwości odstraszające owady, jednocześnie nie wpływa ujemnie na zdrowotność zwierząt roślinożernych [13]. S i e g e l i wsp. [82] podają, że jest ona obecna w większości traw zasiedlonych przez endofity, które wytwarzają także alkaloidy sporyszowe (50%), lolinowe (35%) i lolitremy (10%).

Wykazano, że stężenie alkaloidów w roślinie zależy zarówno od genotypu rośliny, rodzaju komórki, jak i pory roku oraz abiotycznych warunków środowiska [20]. L y o n s i wsp. [54] stwierdzili, że koncentracja alkaloidów sporyszowych, do których należy ergowalina, w kostrzewie łąkowej była wyższa przy zwiększonej dawce nawozów azotowych oraz wyższa w pochwach liściowych w porównaniu do blaszek liściowych. Zawartość zarówno lolitremu B, ergowaliny jak i peraminy na pastwiskach wykazuje sezonowe zróżnicowanie [29]. Najniższe stężenia tych alkaloidów występuje się na przełomie zimy i wczesnej wiosny, zaś najwyższe ich ilości na przełomie lata i jesieni [6, 29]. Ponadto niższa koncentracja lolitremu B była w odrastających po ścięciu roślinach. Często okres, w którym alkaloidy występują w trawach w najwyższych stężeniach, nie pokrywa się z czasem wystąpienia objawów chorobowych u zwierząt. Powodem tego jest ich kumulowanie się w tkance tłuszczowej, a następujące potem stopniowe uwalnianie (np. pod wpływem wysokiej temperatury). Tłumaczy to występowanie objawów chorobowych po pewnym czasie u zwierząt przeniesionych z pastwiska o dużej zawartości tego alkaloidu, na pastwisko od niego wolne [57].

Alkaloidy produkowane przez endofity wpływają również na pobieranie pokarmu przez zwierzęta. Badania przeprowadzone w USA wykazały, że bydło wypasane na pastwiskach, gdzie rośliny były zakażone endofitami, spędzało mniej czasu na pobieraniu pokarmu niż bydło wypasane na pastwiskach wolnych od endofitów. Można zatem sądzić, iż zwierzęta preferowały rośliny wolne od grzybów endofitycznych [39]. Pobieranie paszy zawierającej szkodliwe alkaloidy nie pozostaje również bez wpływu na wydajność oraz jakość produktów pochodzenia zwierzęcego. Badania przeprowadzone w Australii [71] wykazały, że bydło wypasane na pastwiskach porośniętych życicą trwałą z wysoką zawartością lolitremu B, wytwarzało gorszej jakości mleko. Zawierało ono mniej tłuszczu i białka, niż mleko pochodzące od zwierząt, które wypasane były na pastwiskach wolnych od endofitów.

Ważnymi czynnikami warunkującymi proces produkcji alkaloidów przez grzyby endofityczne są warunki pogodowe, a przede wszystkim ilość opadów atmosferycznych i temperatura powietrza [76]. Wzmożona produkcja alkaloidów odbywa się gdy roślina zasiedlona przez nie zostaje poddana stresowi suszy [98].

Występowanie symptomów chorobowych w dużej mierze zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz od ekstremalnych temperatur panujących na danym terenie [24]. Gdy wraz ze spożyciem toksyny zwierzę jest jednocześnie poddane działaniu wysokich temperatur, to następuje brak kontroli temperatury ciała i równowagi wodnej. Ponadto takie zwierzę spożywa mniej pokarmu, a z tym wiąże się spadek masy ciała. W chłodniejszych warunkach zwierzęta mogą cierpieć na choroby kończyn, spowodowane prawdopodobnie skurczem naczyń hamującym przepływ krwi, a związanym z działaniem ergowaliny.

K e m p i wsp. [43] donoszą, że znaczne stężenie ergowaliny występuje tylko latem i jesienią i tylko w niektórych latach. Siano lub kiszonka, zebrane w tych okresach mogą potencjalnie zawierać duże jej ilości, ale jeśli jej obecność w paszy jest na poziomie, który nie przekracza 50% suchej masy całkowitej dziennej dawki żywieniowej, to mało prawdopodobne wydaje się wystąpienie u zwierząt objawów klinicznych. Ponadto ergowalina w dalszym ciągu jest obecna w paszy nawet po kilku latach magazynowania. W związku z tym, przechowywanie zainfekowanych roślin lub słomy nie wpływa na obniżenie zawartości ergowaliny, a co za tym idzie nie czyni takiej paszy bezpieczniejszej dla zdrowia zwierząt. Proces kiszenia także nie zmniejsza toksyczności, ani stężenia tego alkaloidu [26].

Z punktu widzenia szkodliwości pastwisk zainfekowanych przez grzyby endofityczne, najważniejsze jest monitorowanie produkcji lolitremu B oraz ergowaliny, gdyż właśnie te dwa alkaloidy odpowiadają za występowanie chorób u bydła.

6. Wpływ alkaloidów na odporność traw na stresy

Oprócz niekorzystnego wpływu alkaloidów na zwierzęta hodowlane, substancje te działają pozytywnie na wzrost i rozwój traw np. na zwiększenie odporności na szkodniki, czy odporności na suszę [13, 72]. Wiadomo również, że endofity wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem ilościowej i jakościowej produkcji alkaloidów, co decyduje o ich przydatności do celów pastewnych lub trawnikowych [18, 50]. W Stanach

Zjednoczonych, Nowej Zelandii oraz w krajach Europy przeprowadzono wiele badań, które dokumentują podwyższoną odporność zainfekowanych przez grzyby endofityczne traw na stresy zarówno biotyczne, jak i abiotyczne. Jednak nie zawsze otrzymane wyniki są jednoznaczne. Niewątpliwie najlepiej udokumentowano wpływ obecności endofitów, a w zasadzie produkowanych przez nie alkaloidów, na odporność traw na stres suszy. Jednak jest wiele doniesień dotyczących wpływu tych związków także na inne stresy abiotyczne i biotyczne. Znane są informacje o ich wpływie na zimotrwałość, oszczędną gospodarkę azotem, lepszą przyswajalność fosforu, odporność na *Listronotus bonariensis*, głównego szkodnika pastwisk [74], chrząszcza *Phaedon cochleariae* (*F.*), niektóre mszyce *Rhopalsiphum maidis* i *Drosophila melanogaster* czy gąsiennice *Spodeptera frugiperda* [84]. Również prowadzone są badania dotyczące wpływu grzybów endofitycznych na rozwój innych mikroorganizmów występujących na trawach [61, 63, 89].

6.1. Stresy abiotyczne

Endofity wzbudzają w roślinach traw mechanizmy tolerancji na suszę, jednakże cecha ta zależna jest od gatunku, odmiany i fazy rozwojowej, w jakiej znajduje się roślina [64]. Duże znaczenie ma też lepsza zdolność do regeneracji uszkodzeń po suszy. Ten korzystny aspekt obecności grzybów endofitycznych w trawach został najlepiej udokumentowany w przypadku kostrzewy trzcinowej [2, 3]. U innych gatunków traw, np. życycy trwałej wyniki badań dotyczące odporności na suszę nie są tak jednoznaczne [15, 25, 38, 92]. Elbersen i West [25] stwierdzili, że endofity mogą wpływać na większą retencję wody w liściach, co skutkuje lepszą ochroną rośliny przed wysuszeniem. Hill i wsp. [38] oraz White i wsp. [92] nie obserwowali różnic w tolerancji na stres suszy między roślinami E+ i E– kostrzewy trzcinowej, jednak sugerowali, że endofity mogą wpływać pośrednio na morfologiczne i fizjologiczne przystosowania rośliny do unikania suszy, za pomocą mechanizmów pozwalających na utrzymanie właściwego stanu wody. Zaś Cheplick i wsp. [15] obserwowali genotypową zmienność zdolności roślin do odrastania po okresie suszy, na który to proces endofity nie miały wpływu lub odgrywały w nim nieznaczną rolę.

Malinowski i Belesky [55] stwierdzili, że endofity wpływają na oszczędną gospodarkę azotem i lepszą przyswajalność fosforu, a także poprawiają żywotność siewek i ich krzewienie, co potwierdzają australijskie badania przeprowadzone w 1999 i 2000 roku nad życicą trwałą [71].

W europejskich warunkach klimatyczno-glebowych korzystne efekty występowania endofitów w trawach w porównaniu do roślin nie zasiedlonych przez te grzyby nie są jednoznaczne. Badania nad czynnikami abiotycznymi, takimi jak deficyt wody, koszenie, zacienienie, niskie nawożenie azotem, lub niskie pH gleby wykazały zróżnicowane reakcje roślin, w zależności od układu genotyp rośliny – genotyp endofita [53].

6.2. Stresy biotyczne

Potencjalną przydatność *Neotyphodium* spp. do zwalczania chorób roślin przez ich zainfekowanie pożądanymi endofitami tego rodzaju, było badane w doświadczeniach *in vitro* [81]. Badania te wykazały, że izolaty tych grzybów wyhodowane na płytkach agarowych hamowały wzrost kolonii licznych grzybów chorobotwórczych traw, w tym *Rhizoctonia solani*, *R. zeae*, *Bipolaris sorokiniana* i *Colletotrichum graminicola*, a aktywność przeciwgrzybicza różniła się między poszczególnymi izolatami. Jednak w naturze dla wielu mikroorganizmów obserwuje się niską korelację między skutkami antybiozy pomiędzy kulturami grzybów w warunkach laboratoryjnych, a oddziaływaniem na choroby w polu [21]. Potwierdzają to doświadczenia polowe prowadzone przez Burpee i Bouton [12], które wykazały, że obecność endofitów nie dała ochrony roślinom kostrzewy trzcinowej przeciwko występującemu w glebie patogenowi *R. solani*. Również zakażone endofitami siewki kostrzewy trzcinowej nie były chronione przed infekcją *B. sorokiniana* [87] oraz patogenami często obserwowanymi na trawnikach: *Magnaporthe poae* i *Pythium aphanidermatum* [9]. Obecność endofitów w kostrzewie trzcinowej, czy życicy trwałej nie wydaje się także chronić przed wystąpieniem lub nasileniem zgorzeli podstawy źdźbła i korzeni powodowanej przez *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti* i *Pythium acanthicum* [40]. Są też wyniki mówiące o tym, że niektóre izolaty endofitów mogą wpływać na zwiększoną podatność traw na choroby, np. w badaniach Funk'a i wsp. [30] trawy zakażone grzybami endofitycznymi były bardziej podatne na chorobę powodowaną przez grzyby z rodzaju *Pythium*. Przypuszczalnie mogło to być pośrednim skutkiem wpływu endofitów na lepszy wzrost i wygląd trawnika, co z kolei sprzyjało rozwojowi choroby.

Dotychczasowe badania dokumentują odporność zainfekowanych przez grzyby endofityczne traw na 45 gatunków owadów należących do następujących rodzin: *Aphidiadae*, *Chrysomelidae*, *Cicadidae*, *Curculionidae*, *Gryllidae*, *Lygaeidae*, *Miridae*, *Noctuidae*, *Pyralidae*, *Scarabaeidae* i *Tenebrionidae*. Ponadto zasiedlone trawy są odporne na nicienie oraz niektóre choroby jak np. kostrzewa trzcinowa na grzyb *Rhizoctonia zeae* [63, 83]. Jednak oczywiste jest, że oddziaływanie pomiędzy endofitem i gospodarzem może być dosyć zmienne w zależności zarówno od warunków środowiska [75], jak i genotypu gospodarza [8, 25, 38].

Programy hodowlane mają na celu wprowadzanie użytecznych endofitów do odmian i populacji życicy

trwałej i kostrzew. Istniejące techniki inokulacyjne są odpowiednio udoskonalane do szybkiego rozwoju odmian zawierających endofity i do przenoszenia wskazanych endofitów pomiędzy gatunkami [47]. Techniki te są w dalszym ciągu modyfikowane, a ich efektywność kontrolowana w produkcji nasiennej. W czasie przechowywania dostosowuje się i kontroluje warunki środowiska zapewniające utrzymanie wysokiego poziomu żywotności endofitów [31]. Dodatkowo istniejąca wiedza odnośnie obecności endofitów i ich znaczenia sprawia, że ocena odmian i programy hodowlane przydatne do celów trawnikowych są bardziej efektywne i niezawodne.

7. Występowanie endofitów w Polsce i na świecie

Współżycie traw z grzybami znane jest od dawna, ale intensywny rozwój badań nad tą grupą organizmów nastąpił w latach 80-tych XX wieku. Badania przeprowadzone w wielu krajach potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o powszechnym występowaniu endofitów w trawach. Obecność tych grzybów stwierdzono w wielu krajach świata, jednak najwięcej informacji pochodzi z Ameryki Południowej, Nowej Zelandii i Australii, gdzie średnia zawartość endofitów w trawach na pastwiskach sięgała nawet 100% [27, 70]. Wysokie zasiedlenie traw w tych rejonach świata związane jest z częstym narażeniem roślin na stresy środowiskowe. Są również znane doniesienia o występowaniu endofitów w chłodniejszych rejonach np. w Finlandii [88], czy Japonii [44]. L e w i s [52] w swojej pracy podaje, że w latach 1987–1997 obecność endofitów w trawach została potwierdzona w 22 krajach europejskich, w tym również w Polsce i występowały one w ok. 50% przebadanych dzikich populacji europejskich traw.

Krajowe badania dotyczące zasiedlenia runi grzybami z rodzaju *Neotyphodium* wybranych trwałych użytków zielonych na terenie Polski, wykazały, że organizmy te występują powszechnie na pospolitych gatunkach traw. Obecność grzybów endofitycznych stwierdzono w roślinach ekotypów życicy trwałej (*Lolium perenne* L.), życicy wielokwiatowej (*L. multiflorum* Lam.), kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.), kostrzewy czerwonej (*F. rubra* L.), kostrzewy trzcinowej (*F. arundinacea* Schreb.), kostrzewy nitkowatej (*F. capillata* Lam.), kostrzewy olbrzymiej (*F. gigantea* L.), kostrzewy owczej (*F. ovina* L.), tymotki łąkowej (*Phleum pratense* L.), wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.) oraz śmiałka darniowego (*Deschampsia caespitosa* (L.) P.B.) [64, 96, 100]. Wyniki badań przeprowadzonych w innych regionach Europy i świata potwierdzają, że wiele gatunków traw może być zasiedlanych przez endofity z rodzaju *Neotyphodium* [52, 77, 88, 99].

J u i wsp. [42] twierdzą, że głównym czynnikiem wpływającym na wahania częstotliwości występowania endofitów w roślinach jest temperatura. Ich badania wykazały, że niższa częstotliwość występowania tych grzybów w uprawach kostrzewy trzcinowej była zimą i wiosną, gdy średnie miesięczne temperatury były często poniżej minimalnej temperatury wzrostu endofitów, a powyżej minimalnej temperatury dla wzrostu roślin. Można jednak przypuszczać, że oprócz czynnika temperaturowego, może to być związane z jarowizacją, oraz fizjologicznymi i morfologicznymi zmianami zachodzącymi w roślinach. Interakcja pomiędzy endofitem i genotypem rośliny może wpływać na zmienność fenotypową populacji, faworyzując genotypy zasiedlone i przyczyniając się do tzw. zmian mikroewolucyjnych [14]. Trawy zasiedlone przez endofita mogą mieć podwyższoną przeżywalność oraz większą masę części generatywnych i wegetatywnych [19]. Wiosenny odrost roślin zasiedlonych przez endofity może przewyższać odrost roślin wolnych od grzybów symbiotycznych [89]. To z kolei może sprzyjać wypieraniu roślin nie zasiedlonych przez zasiedlone ze stanowisk, zwłaszcza tych o znacznym stopniu zróżnicowania. Ponadto obecność endofitów może wpływać na zahamowanie kiełkowania nasion w warunkach deficytu wodnego, ograniczając tym samym ryzyko wypadania siewek i straty związane ze słabszymi wschodami polowymi [35]. Jednocześnie stwierdzono, że obecność endofitów nie wpływa bezpośrednio na kiełkowanie, jednak ważny jest efekt pośredni, którym jest przedłużenie czasu wzrostu roślin matecznych w czasie rozwijania się i dojrzewania nasion [36].

Oprócz udokumentowanej obecności endofitów w roślinach traw, wiele badań dotyczyło obecności tych grzybów w nasionach [10, 18, 20, 30, 43, 46], gdyż jest to jedyny, jak do tej pory potwierdzony, sposób ich rozprzestrzeniania się. Wykazały one, że nasiona wielu gatunków traw są często zasiedlane przez endofity, a najczęściej obserwowano je u gatunków z rodzaju *Festuca* i *Lolium perenne.* Krajowe badania potwierdzają, że nasiona traw są często zasiedlone przez grzyby endofityczne, czasami w znacznych ilościach (nawet do 98% w przypadku nasion *Festuca ovina* odmiany Jolka) [62, 63, 95, 96]. Stwierdzić również należy, że wśród badanych gatunków traw zasiedlane przez endofity są zarówno nasiona odmian gazonowych, jak i pastewnych. Niepokojąca jest obecność tych grzybów zwłaszcza w odmianach pastewnych. Odmiany te stosowane są na łąki i pastwiska, a produkowane przez nie szkodliwe alkaloidy, mogą stwarzać zagrożenie dla zwierząt.

8. Podsumowanie

Od końca lat 90-tych XX wieku główną strategią jest poszukiwanie takich asocjacji endofit-roślina, które miałyby pozytywny wpływ na właściwości rolnicze traw, a nie wytwarzały alkaloidów (lolitremu i ergowaliny)

szkodliwych dla zwierząt. Prace w tym kierunku prowadzone są głównie w krajach, gdzie trawy, a zwłaszcza życica trwała i kostrzewa trzcinowa, są poddane poważnym stresom biotycznym i abiotycznym i gdzie istnieją oczywiste korzyści w uprawie traw zasiedlonych przez endofity [37]. Jedna ze strategii polega na znalezieniu w naturze takiego związku endofita z trawą, który pozwoliłby na zwiększenie pożądanych cech u rośliny, a zmniejszenie niepożądanych. Inną strategią jest usunięcie z rośliny endofita, który ją zasiedla i ponowne wprowadzenie izolatu wytwarzającego niewielkie ilości alkaloidów [10].

Piśmiennictwo

1. Aldrich C.G., Paterson J.A., Tate J.L., Kerley M.S.: The effects of endophyte infected tall fescue consumption on diet utilization and thermal regulation in cattle. *J. Anim. Sci.* **71**, 164–170 (1993)
2. Arachevaleta M.C., Bacon C.W., Hoveland C.S., Radcliffe D.E.: Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy J.*, **81**, 83–90 (1989)
3. Bacon C.W.: Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **44**, 123–141 (1993)
4. Bacon C.W., Hill N.S. eds.: *Neotyphodium*/grass interactions. Plenum Press. New York. (1997)
5. Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D., Luttrell E.S.: *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 576–581 (1977)
6. Ball O.J.P., Prestidge R.A., Sprosen J.M.: Interrelationships between *Acremonium lolii*, Peramine, and Lolitrem B in Perennial Ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(4)**, 1527–1533 (1995)
7. Barker G.M., Pottinger R.P., Adison P.J., Prestidge R.A.: Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on behavior of adult Argentine stem weevil. *New Zealand J. Agric. Res.* **27**, 271–277 (1984)
8. Belesky D.P., Devine O.J., Pallas J.E., Jr, Springer W.C.: Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. *Phytosynthetica*, **21**, 82–87 (1987)
9. Blank C. A., Gwinn K. D.: Soilborne seedling diseases of tall fescue: influence of the endophyte *Acremonium coenophialum*. *Phytopathology*, **82**, 1089 (1992)
10. Bouton J.H., Hopkins A.A.: Commercial applications of endophytic fungi. In Clavicipitalean fungi: Evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. White J.F., Bacon C.W., Hywel-Jones N., Spatafora J.W. eds.; Marcel Dekker, Inc. New York Basel. p. 495–516 (2003)
11. Bultman T.L., White J.F.Jr., Bowdish T.I., Welch A.M., Johnston J.: Mutualistic transfer of *Epichloë* spermatia by *Phorbia* flies. *Mycologia*, **87**, 182–187 (1995)
12. Burpee L. L., Bouton J. H.: Effect of eradication of the endophyte *Acremonium coenophialum* on epidemics of *Rhizoctonia* blight in tall fescue. *Plant Dis.* **77**, 157–159 (1993)
13. Bush L.P., Wilkinson H.H., Schardl C.L.: Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.* **114**, 1–7 (1997)
14. Cheplick G.P., Cho R.: Interactive effects of fungal endophyte infection and host genotype on growth and storage in *Lolium perenne*. *New Phytologist*, **158**, 183–191 (2003)
15. Cheplick G.P., Perera A., Koulouris K.: Effect of drought on the growth of *Lolium perenne* genotypes with and without fungal endophytes. *Functional Ecology*, **14**, 657–667 (2000)
16. Chlebicki A.: Od pasożytnictwa do mutualizmu, konsekwencje długotrwałych interakcji. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych*, **53**, 69–73 (2004)
17. Christensen M.J., Bennett R.J., Schmid J.: Growth of *Epichloë*/*Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycol. Res.* **106**, 93–106 (2002)
18. Christensen M.J., Leuchtmann A. Rowan A.A., Tapper B.A.: Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.* **97**, 1083–1092 (1993).
19. Clay K.: Comparative demography of the three graminoids infected by systemic, Clavicipitaceae fungi. *Ecology*, **71(2)**, 558–570 (1990)
20. Clay K., Schardl C.: Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist* (*Suppl.*), **160**, 99–127 (2002)
21. Cook R. J., K. F. Baker.: The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota. pp. 539 (1983)
22. Cornell C.N., Lueker J.V., Garner G.B., Ellis J.L.: Establishing ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. In: Joost R.E., Quisenberry S.E. (Eds.). Proccedings of the International *Acremonium*/Grass Interactions. Louisiana Agricultural Experiment Station, Baton Rouge: 75–79 (1990)
23. Cross D.L.: Toxic effects of *Neotyphodium coenophialum* in cattle and horses. Proccedings of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interaction Symposium. 219–235 (2000)
24. Dougherty C.T., Lauriault L.M., Bradley N.W., Gay N., Cornelius P.L.: Induction of tall fescue toxicosis in heat-stressed cattle and its alleviation with thiamin. *J. Anim. Sci.* **69**, 1008–1018 (1991)
25. Elbersen H.W., West C.P.: Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science*, **51**, 333–342 (1996)
26. Fletcher L.R.: Managing ryegrass-endophyte toxicosis. In: Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E. (eds), *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publ. 229–241 (2005)
27. Fletcher L.R., Easton H.S.: Using endophytes for pasture improvement in New Zealand. Proc. of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany, 149–162 (2000)
28. Fletcher L.R., Harley I.C.: An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Vet. J.* **29**, 185–186 (1981)
29. Fletcher L.R., Lane G.A., Baird D.B., Davies E.: Seasonal variations of alkaloids concentrations in two perennial ryegrass-endophyte associations. Proceedings of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, 535–542 (2000)
30. Funk C.R., Belanger F.C., Murphy J.A.: Role of endophytes in grasses used for turf and soil conservation. In: Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon Ch.W., White J.F.Jr. (eds). CRC Press., Boca Raton, 201–209 (1994)
31. Funk C.R., Clarke B.B.: Turfgrass breeding – with special reference to turf-type perennial ryegrass, tall fescue and endophytes. The 6th Internat. Turf Res. Conf., Tokio, July 31 August, 3–10 (1989)
32. Funk C.R., White J.F.Jr.: Use of natural and transformed endophytes for turf improvement. In Bacon and Hill ed., *Neotyphodium*/Grass Interactions, Plenum Press, New York. (1997)
33. Gallagher R.T., Hawkes A.D., Stewart J.M.: Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromat.* **321**, 217–226 (1985)

34. Glenn A.E., Bacon C.W., Price R., Hanlin R.T.: Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, **88**, 369–383 (1996)
35. Gundel P.E., Maseda P.H., Vila-Aiub M.M., Ghersa C.M., Benech-Arnold R.: Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany*, **97**, 571–577 (2006)
36. Gundel P.E., Maseda P.H., Ghersa C.M., Benech-Arnold R.: Effects of the *Neotyphodium* endophyte fungus on dormancy and germination rate of *Lolium multiflorum* seeds. *Austral Ecology*, **31**, 767–775 (2006)
37. Hill N.S., Bouton J.H., Thompson F.N., Hawkins C.S., Hoveland C.S., Cann M.A.: Performance of tall fescue germplams bred for high and low ergot alkaloids. *Crop Sci.* **42**, 518–523 (2002)
38. Hill N.S., Pachon J.G., Bacon C.W.: *Acremonium coenophialum*-mediated short- and long-term drought acclimation in tall fescue. *Crop Sci.* **36**, 665–672 (1996)
39. Hopkins A.A., Alison M.W.: Stand persistence and animal performance of tall fescue endophyte combinations in South Central USA. *Agronomy J.*, **98**, 1221–1226 (2006)
40. Hume D. E., Quigley P. E., Aldaoud R.: Influence of *Neotyphodium* infection on plant survival of diseased tall fescue and ryegrass. p. 171–173. *In* C.W. Bacon, and N.S. Hill (ed.) *Neotyphodium*/grass interactions. C.W. Bacon, and N.S. Hill (ed.) Plenum Press, New York. 171–173 (1997)
41. Johnson M.C., Dahlman D.L., Siegel M.R., Bush L.P., Latch G.C.M., Potter D.A., Varney D.R.: Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Appl. Environ. Microbiol.* **49(3)**, 568–571 (1985)
42. Ju H.J., Hill N.S., Abbott T., Ingram K.T.: Temperature influences on endophyte growth in tall fescue. *Crop Sci.* **46**, 404–412 (2006)
43. Kemp H., Bourke C.H., Wheatley W.: Endophytes of perennial ryegrass and tall fescue. *Primefacts*, **535**, 1–5 (2007)
44. Koga H., Tsukiboshi T., Uematsu T.: Incidence of the endophyte fungus *Acremonium uncinatum* in Meadow Fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido. *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.* **49**, 35–41 (1993)
45. Koga H., Hirai Y., Kanda K., Tsukiboshi T., Uematsu T.: Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. *Japan Agric. Res. Quart.* **31**, 109–115 (1997)
46. Latch G.C.M., Christensen M.J.: Ryegrass endophyte, incidence and control. *N.Z.J. Agric. Res.* **25**: 443–448 (1982)
47. Latch G.C.M., Christensen M.J.: Artificial infection of grasses with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* **107**, 17–24 (1985)
48. Latch G.C.M., Hunt W.F., Musgrave D.R.: Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N.Z.J. Agric. Res.* **28**, 165–168 (1985)
49. Leuchtmann A.: Systematics, distribution and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* **1**, 150–162 (1992)
50. Leuchtmann A., Schmidt D., Bush L.P.: Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed--transmitted *Epichloë*/*Neotyphodium* endophytes. *J. Chem. Ecol.* **26**, 1025–1036 (2000)
51. Lewis G.C.: A review of research on endophytic fungi worldwide, and its relevance to European grassland, pastures and turf. The 2nd International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn K., Paul V.H. (eds.) *IOBC wprs Bulletin*, **19 (7)**, 17–25 (1996)
52. Lewis G.C.: *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity, and host in Europe. Proc. of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interaction Symposium. Soest, Germany. 123–130 (2000)
53. Lewis G.C.: Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Ann. Appl. Biol.* **144**, 53–63 (2004)
54. Lyons P.C., Plattner R.D., Bacon C.W.: Occurrence of peptide and clavinet ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science*, **232**, 487–489 (1986)
55. Malinowski D.P., Belesky D.P.: Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* **40**, 923–940 (2000)
56. Márquez S.S., Bills G.F., Zabalgogeazcoa I.: The endophytic community of *Dactylis glomerata* . In Proceedings of the 6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, eds. A.J. Popay and E.R. Thom, pp. 69–73. Christchurch, New Zealand. New Zealand Grassland Association (2007)
57. Miyazaki S., Ishizaki I., Ishizaka M., Kanbara T., Ishiguro--Takeda Y.: Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw. *J. Vet. Diagn. Investig.* **16**, 340–342 (2004)
58. Morgan-Jones G., Gams W.: Notes on Hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon.* **15**, 311–318 (1982)
59. Müller Ch. B., Krauss J.: Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion Plant Biology*, **8**, 450–456 (2005)
60. Panaccione D.G., Johnson R.D., Wang J., Young C.A., Damrongkool P., Scott B., Schardl C.L.: Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98(22)**, 12820–12825 (2001)
61. Pańka D.: Meadow fescue infestation with *Neotyphodium uncinatum* and influence of endophyte on growth of microorganisms in vitro. In: Lloveras J., Gonzales-Rodriguez A., Vazquez--Yanez O., Pineiro J., Santamaria O., Olea L., Poblaciones M.J. (eds). Sustainable Grasslands Productivity. *Grassland Science in Europe*, **11**, 469–471 (2006)
62. Pańka D., Sadowski C.: Occurrence of fungal endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars in Poland. In: Multi-functional grasslands quality forages, animal products and landscapes. Durand J.L. et al., (eds.). Grassland Science in Europe **7**, 540–541 (2002)
63. Pańka D., Podkówka L., Lamparski R.: Preliminary observations on the resistance of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) infected by *Neotyphodium uncinatum* to diseases and pests and native value. In: Proc. of the 5th International Symposium on *Neotyphodium*/Grass Interactions. Kallenbach R. et al. (eds.). Fayetteville, AR USA, May 23–26, 2004. **401**, 88–90 (2004)
64. Pańka D., Żurek G.: Występowanie grzybów endofitycznych w trawach gazonowych a ich podatność na stres suszy. *Łąkarstwo w Polsce*, **8**, 45–54 (2005)
65. Peters C.W., Grigsby K.N., Aldrich C.G., Paterson J.A., Lipsey R.J., Kerley M.S., Garner G.B.: Performance, forage utilization, and ergovaline consumption by beef cows grazing endophyte fungus infected tall fescue, endophyte tall fescue, or orchardgrass pastures. *J. Anim. Sci.* **70**, 1550–1561 (1992)
66. Pfannmöller M., Eggestein S., Schöberlein W.: Endophytes in European varieties of *Festuca* species. *IOBC wprs Bulletin*, **17/1**, 101–109 (1994)
67. Plowman T.C., Leuchtmann A., Blaney C., Clay K.: Significance of the fungus *Balansia cyperi* infecting medicinal species of *Cyperus* (Cyperaceae) from Amazonia. *Economic Botany*, **44**, 452–462 (1990)

68. Porter J.K.: Chemical constituents of grass endophytes. In: C.W. Bacon and J.F. White , Jr. (ed) Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC Press, Boca Raton, FL. 103–123 (1994)
69. Prończuk M.: Endofity traw – znaczenie, występowanie i metody wykrywania. Przegląd literatury. *Biul. IHAR*, **235**, 297–309 (2005)
70. Reed K.M., Walsh J.R., McFarlanne N.M., Cross P.A.: Australian perennial ryegrass pasture, endophyte frequency and associated alkaloid concentrations. Proc. of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany. 31–39 (2000)
71. Reed K.: The significance of the ryegrass endophyte, *Neotyphodium lolii,* In Victorian pasture. www.animal-welfare.org.au/comm/download/abs02.html. (2002)
72. Richardson M.D., Hoveland C.S., Bacon C.W.: Photosynthesis and stromatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. *Crop Sci.* **33**, 145–149 (1993)
73. Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E. eds: *Neotyphodium* in cool--season grasses. Ames, IA: Blackwell Publishers. (2005)
74. Rowan D.D., Dymock J.J., Brimble M.A.: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *J. Chem. Ecol.* **16**, 1683–1695 (1990)
75. Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., Sullivan T.J.: Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecology Systematics*, **29**, 319–343 (1998)
76. Salminen S.O., Richmond D.S., Grewal S.K., Grewal P.S.: Influence of temperature on alkaloid levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**, 417–426 (2005)
77. Schardl C.L., Philips T.D.: Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Dis.* **81**, 430–438 (1997)
78. Schardl C.L., Leuchtmann A.: The *Epichloë* endophytes of grasses and the symbiotic continuum. In The fungal community: its organization and role in the ecosystem, 3rd ed., eds. J. Dighton, J.F. White, Jr., and P. Oudemans, Boca Raton, FL. CRC Press. pp. 475–503 (2005)
79. Schardl C.L., Leuchtmann A., Spiering M.J.: Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann. Rev. Plant Biology*, **55**, 315–340 (2004)
80. Schulthess F.M., Faeth S.H.: Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of *Arizona fescue* (*Festuca arizonica*). *Mycol.* **90**, 569–578 (1998)
81. Siegel M.R., Latch G.C.M.: Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes. *Mycol.* **83**, 529–537 (1991)
82. Siegel M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C.: Fungal endophyte--infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* **16**, 301–315 (1990)
83. Siegel M.R., Latch G.C.M., Johnson M.C.: *Acremonium* fungal endophytes of Tall Fescue and Perennial ryegrass: significance and control. *Plant Dis.* **69/2**, 179–183 (1985)
84. Siegel M.R., Latch G.C.M., Johnson M.C.: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**, 293–315 (1987)
85. Tadych M., White J.F.Jr.: Ecology of epiphyllous stages of endophytes and implications for horizontal dissemination. In Proceedings of the 6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, eds. A.J. Popay and E.R. Thom, pp. 157–161. Christchurch, New Zealand. New Zealand Grassland Association. (2007)
86. Tan Y.Y.M., Spiering M.J., Scott V., Lane G.A., Christensen M.J., Schmid J.: In planta regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl. Environment. Microbiol.* **67**, 5377–5383 (2001)
87. Trevathan L. E.: Performance of endophyte-free and endophyte-infected tall fescue seedlings in soil infected with *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Plant Pathol.* **18**, 415–418 (1996)
88. Wäli P., Saikkonen K., Helander M., Lehtimki S., Lehtonen P.: Seed transmitted endophytic fungi in wild grass populations in Finland. Proceedings of the 4th International Neotyphodium/Grass Interaction Symposium. Soest. Germany. 93–96 (2000)
89. Wäli P.R., Helander M., Nissinen O., Saikkonen K.: Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Canadian Journal of Botany*, **84**, 1043–1051 (2006)
90. White J.F.Jr.: Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Dis.* **71**, 340–342 (1987)
91. White J.F.Jr.: Systematic of the graminicolous Clavicipitaceae: applications of morphological and molecular approaches. In *Neotyphodium*/Grass interactions, eds. C.W. Bacon and N.S. Hill. New York. Plenum Press. pp. 27–39 (1997)
92. White J.F.Jr., Engelke M.C., Morton S.J., Johnson-Cicalese J.M., Ruemmele B.A.: *Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance. *Crop Sci.* **32**, 1392–1396 (1992)
93. White J.F.Jr., Morgan-Jones G., Morrow A.C.: Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems Environment*, **44**, 13–37 (1993)
94. White J.F.Jr., Reddy P.V.: Examination of structure and molecular phylogenetic relationships of some Graminicolous symbionts in genera *Epichloë* and *Parepichloë*. *Mycologia*, **90**, 226–234 (1998)
95. Wiewióra B., Prończuk M.: Porównanie metody mikroskopowej i immunologicznej do wykrywania grzybów endofitycznych w nasionach traw. *Biul. IHAR*, **242**, 277–284 (2006)
96. Wiewióra B., Prończuk M., Ostrowska A.: Infekcja nasion traw przez endofity w kolejnych latach użytkowania plantacji. *Biul. IHAR*, **242**, 285–293 (2006)
97. Wille P.A., Aeschbacher R.A., Boller T.: Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected grasses. *Plant J.* **18(4)**, 349–358 (1999)
98. Zabalgogeazcoa I., Bony S.: *Neotyphodium* research and application in Europe. *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publ. 27–33 (2005)
99. Zabalgogeazcoa I., Vázquez de Aldana B. R., Ciudad G., Criado G.: Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Sci.* **58**, 94–97 (2003)
100. Żurek M., Wiewióra B., Żurek G.: Występowanie grzybów endofitycznych na trwałych użytkach zielonych województwa mazowieckiego. *Biul. IHAR*, **256**, 171–181 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2014, 53, 1, 81–86
http://www.pm.microbiology.pl

BAKTERIE PATOGENNE DLA CEBULI (*ALLIUM CEPA* L.)

Beata Kowalska[1]*, Urszula Smolińska[1]

Pracownia Mikrobiologii, Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. *Burkholderia cepacia* (Burkholder) Yabuuchi et al. 3. *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young i wsp. 4. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* Migula 5. *Serratia plymuthica* i *Serratia marcescens* Bizio. 6. *Pantoea ananatis* (Serrano) Mergaert i wsp. 7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend. Hauben i wsp. i *Dickeya chrysanthemi* Samson i wsp. 8. *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche et Edwards. 9. Podsumowanie

Onion (*Allium cepa* L.) pathogenic bacteria

Abstract: Bacterial diseases cause serious problems in cultivation of onion (*Allium cepa* L.) in Poland and abroad. There are several reasons of the losses in onion production caused by these diseases, e.g. weather conditions, biology and epidemiology of bacteria, lack of efficient pesticides, lack of disease-resistant cultivars. According to reports, onion is infected by following bacterial pathogens: *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, *Burkholderia cepacia*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum, Dickeya chrysanthemi, Serratia plymuthica, Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* and *Pseudomonas viridiflava*.

1. Introduction. 2. *Burkholderia cepacia* (Burkholder) Yabuuchi et al. 3. *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al. 4. Genus *Pseudomonas* Migula bacteria 5. *Serratia plymuthica* and *Serratia marcescens* Bizio. 6. *Pantoea ananatis* (Serrano) Mergaert et al. 7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend. Hauben et al. and *Dickeya chrysanthemi* Samson et al. 8. *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche et Edwards. 9. Summary

Słowa kluczowe: bakteriozy, cebula, patogeny
Key words: bacterial diseases, onion, pathogens

1. Wstęp

Od kilku lat w Polsce notuje się znaczny wzrost liczby chorób bakteryjnych roślin warzywnych, w tym również cebuli. Poważne straty zauważalne są w uprawach polowych, w transporcie oraz szczególnie podczas przechowywania. Przyczyną nasilenia chorób bakteryjnych są między innymi warunki atmosferyczne – wysoka temperatura w okresie wegetacji warzyw, duże ilości opadów, gradobicia, silne wiatry, okresowe podtopienia pól. Ponadto, ze względu na brak wystarczająco skutecznych środków ochrony istnieją ogromne trudności w zapobieganiu tym chorobom. Bakteriozy rozwijają się bardzo szybko, a początkowy proces chorobowy jest trudno zauważalny [1, 16, 39].

Rozwój choroby bakteryjnej jest efektem wzajemnej interakcji między patogenem, rośliną i środowiskiem. Zależy od procesów metabolicznych indukowanych w zainfekowanej roślinie, aktywności bakteryjnych czynników warunkujących patogenezę oraz warunków środowiskowych. Objawy chorobowe powstają tylko w określonych, korzystnych dla rozwoju choroby warunkach.

Zakażenie roślin przez bakterie odbywa się zwykle w sposób pasywny. Zazwyczaj bakterie wnikają do rośliny poprzez uszkodzenia mechaniczne tkanek powstałe w trakcie uprawy, zbioru lub transportu plonów. Głównym źródłem pierwotnego zakażenia są chore rośliny i zakażone resztki roślinne pozostające na polu. Dużym zagrożeniem są także zabrudzone glebą maszyny, narzędzia, obuwie. Ponadto bakterie mogą przeżywać w ciekach wodnych, skąd wraz z wodą pobieraną do nawadniania pól, trafiają na plantacje. Istotną rolę w przenoszeniu bakterii zarówno w polu, jak i w przechowalni odgrywają owady – szkodniki cebuli. Ułatwiają wnikanie bakterii do wnętrza cebuli poprzez wytworzone zranienia na jej powierzchni, a ponadto przenoszą bakterie na zdrowe rośliny [1, 16].

Istotną rolę w rozprzestrzenianiu bakteryjnych chorób warzyw odgrywają nasiona. Przenoszą one bakterie na duże odległości zarówno w obrębie jednego kraju, ale także na inne kontynenty. Nasiona mogą być także miejscem zimowania patogenów bakteryjnych, co ma szczególne znaczenie dla bakterii nie wytwarzających przetrwalników. Z zakażonych nasion bakterie rozprzestrzeniają się na siewki, zapoczątkowując proces chorobowy rozwijających się roślin [9, 30].

Cebula (*Allium cepa* L.) porażana jest przez następujące Gram-ujemne bakterie: *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, *B. cepacia*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia plymuthica*, *S. marcescens*, *Pantoea ananatis* oraz różne gatunki *Pseudomonas* [8, 15, 22, 39].

* Autor korespondencyjny: Pracownia Mikrobiologii, Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice; tel. 46 833 29 71; e-mail: Beata.Kowalska@inhort.pl

2. *Burkholderia cepacia* (Burkholder) Yabuuchi i wsp.

Burkholderia cepacia to urzęsiona lofotrichalnie pałeczka o wymiarach 0,5–1,0 × 1,5–4,0 µm, występująca pojedynczo lub w parach. Większość szczepów to bezwzględne tlenowce, wytwarzające niefluoryzujące żółtawe lub zielonkawe barwniki. Optymalna temperatura dla wzrostu wynosi 30–35°C, chociaż większość szczepów rośnie również w temperaturze 41°C, nie zaobserwowano natomiast wzrostu w 4°C. Bakteria ta akumuluje w komórkach kwas poli-β-hydroksymasłowy (PHB), jako rezerwowe źródło węgla [36].

B. cepacia posiada genom złożony z 2–4 dużych chromosomów. Wielkość całego genomu wynosi 4–9 Mb, czyli ponad dwukrotnie przekracza wielkość genomu *Escherichia coli* [33]. Ponadto posiada ona liczne elementy insercyjne (IS). Procesy przemieszczania się sekwencji IS w obrębie genomu stanowią znaczące źródło zmienności genetycznej. Poza indukcją mutacji insercyjnych mogą one powodować inne rodzaje przegrupowań materiału genetycznego tj. inwersje, delecje, duplikacje oraz fuzje replikonów. Elementy insercyjne sprzyjają genetycznym zmianom i modyfikują ekspresje genów sąsiadujących. Taka plastyczność genomu może przyczyniać się do dużej zmienności *B. cepacia* pod względem wymagań pokarmowych i adaptacyjnym. Cecha ta umożliwia występowanie *B. cepacia* w zróżnicowanych miejscach w środowisku [25, 45].

Szczepy bakterii *B. cepacia* zostały sklasyfikowane w kilku różnych genetycznie gatunkach, które razem tworzą kompleks zwany *B. cepacia complex*. Obecnie wśród tego kompleksu wyróżnia się przynajmniej 17 różnych pod względem genetycznym gatunków. U bakterii tych stwierdzono średni poziom podobieństwa hybrydyzacji DNA-DNA (30–60%), ale wysokie podobieństwo na podstawie analizy porównawczej sekwencji 16S rRNA (> 97,5%) [45].

Gatunek *B. cepacia* znany jest jako sprawca bakteriozy na cebuli, w literaturze zwanej kwaśną skórką (*sour skin*). Choroba ta stanowi poważny problem w warzywnictwie, gdyż prowadzi do dużych strat w plonie cebuli, czasami sięgających nawet 50%. Zniszczenia spowodowane przez tę bakterię zauważalne są często dopiero w przechowalniach, mimo że infekcja cebul występuje już na polu. Patogen obecny w glebie lub wodzie wnika do tkanek poprzez zranienia w okolicy szyjki lub na liściach, powstałe np. po załamaniu szczypioru lub wskutek mechanicznego uszkodzenia [17] i przemieszcza się w tkankach szczypioru w kierunku główki cebuli. Zewnętrzne łuski stają się śluzowate, przybierają zabarwienie od jasnożółtego do jasnobrązowego. Wewnętrzne łuski oraz środkowa część cebuli pozostają niezasiedlone. Suche zewnętrzne łuski mogą łatwo ulec oddzieleniu podczas ręcznego wyrywania cebul, ukazując porażoną część cebuli. Temperatura sprzyjająca rozwojowi choroby to ponad 30°C. Czasami, szczególnie u młodych roślin, infekcja pozostaje utajona, a symptomy pojawiają się, gdy zaczyna tworzyć się cebula [15, 39, 41].

Stwierdzono, że fitopatogeniczne izolaty *B. cepacia,* w środowisku o niskim pH, produkują enzym endopoligalakturonazę, który jest odpowiedzialny za maceracją tkanki cebuli. Zidentyfikowano *locus cep* na chromosomie, zawierający geny odpowiedzialne za wytwarzanie tego enzymu [2, 3]. Endopoligalakturonazy nie wykryto u szczepów chorobotwórczych dla człowieka i izolatów glebowych niefitopatogenicznych. Szczepy te nie są w stanie macerować tkanek roślinnych [50]. Ponadto w badaniach *in vitro* wyka zano, że izolaty patogeniczne dla roślin mają zdolność do produkcji metabolitów takich jak antybiotyki i siderofory, o działaniu antybakteryjnym i antygrzybowym. Te zdolności ułatwiają konkurencję z innymi mikroorganizmami w środowisku [14].

3. *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young i wsp.

Burkholderia gladioli pv. *alliicola* to tlenowa, ruchliwa pałeczka o wymiarach 0,6 × 2,3–2,8 µm, opatrzona pęczkiem biegunowo umieszczonych rzęsek. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 28–30°C, maksymalna 37–40°C, a minimalna 6°C. Podobnie jak *B. cepacia* bakteria ta akumuluje kwas poli-β-hydroksymasłowy (PHB), jako rezerwowe źródło węgla. Wzrostowi kolonii na pożywkach towarzyszy wytwarzanie żółtawego barwnika, który dyfunduje do podłoża [36].

B. gladioli pv. *alliicola* jest sprawcą miękkiej zgnilizny cebuli (*slippery skin*) zaczynającej się od szyjki. Choroba ta często jest następstwem uszkodzeń szyjki, spowodowanych przez inne patogeny np. *Peronospora destructor* (mączniaka rzekomego) lub przez czynniki atmosferyczne, np. grad. W latach obfitujących w deszcze, bakterioza może być obserwowana w końcowym etapie uprawy cebuli. We wczesnym stadium na powierzchni cebuli nie występują żadne widoczne zmiany, oprócz czasami miękkiej szyjki zauważalnej po naciśnięciu. Na przekroju można zaobserwować jedną lub dwie porażone wewnętrzne łuski mięsiste. Są one miękkie i wyglądają jak nasiąknięte wodą. Z czasem na gnijących łuskach pojawiają się ciemne przebarwienia i dochodzi do mięknięcia i gnicia całej cebuli. Czasami początek choroby może objawiać się w postaci więdnięcia 1–2 środkowych liści, które następnie żółkną i zamierają od góry. Pozostałe młode i stare liście pozostają zielone.

B. gladioli pv. *alliicola* jest szeroko rozpowszechniona na świecie. Powoduje bakteriozę cebuli, m.in. w Stanach Zjednoczonych [15], Anglii [39], Nowej Zelandii, Korei [24], Tajlandii, Hiszpanii, Bułgarii [42], krajach byłego Związku Radzieckiego [43], a także w Polsce [22].

4. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* Migula

Bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* są pałeczkami o wymiarach 0,5–1,0 × 1,5–4,0 µm. Komórki, dzięki polarnemu urzęsieniu, posiadają zdolność ruchu. Cechą charakterystyczną niektórych pseudomonadów jest zdolność do produkcji na ubogiej w żelazo pożywce King B barwnika – fluoresceiny, który fluoryzuje w świetle UV (366 nm) na zielononiebiesko. Fluorescencja jest charakterystyczna zarówno dla patogenicznych, jak i saprotroficznych pseudomonadów i jest pierwszą rozpoznawalną cechą po izolacji bakterii z tkanki roślinnej. Bakterie należące do tego rodzaju posiadają wiele cech biochemicznych, które wykorzystuje się do identyfikacji gatunkowej. Badaniu podlegają według testów „LOPAT" m.in. następujące cechy: zdolność do wytwarzania wielocukru lewanu, obecność oksydazy cytochromowej c, aktywność pektynolityczna, wytwarzanie dihydrolazy argininy i wywołanie reakcji nadwrażliwości na liściach tytoniu. Niemal wszystkie patogeniczne bakterie z tego rodzaju nie rosną w temperaturze 41°C [36].

Rodzaj *Pseudomonas* oprócz gatunków saprotroficznych, obejmuje 14 gatunków patogenicznych, w obrębie których dodatkowo wyróżnia się patowary. Przykładowo gatunek *P. syringae*, który pod względem ekonomicznym jest najważniejszym patogenem roślin, obejmuje ponad 50 patowarów. Cebula porażana jest przez następujące bakterie z rodzaju *Pseudomonas*: *P. aeruginosa* (*bacterial internal brown rot of bulbs*), *P. syringae* (*bacterial leaf spot and flower stalk necrosis*), *P. viridiflava* (*bacterial leaf streak and bulb rot*), *P. marginalis* pv. *marginalis* (*bacterial soft rot*) [8, 20, 22, 28, 31, 49]. Bakterie te powodują głównie różnego rodzaju zgnilizny cebuli.

5. *Serratia plymuthica* i *Serratia marcescens* Bizio

Bakterie z rodzaju *Serratia* należą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Cechą charakterystyczną dla tego rodzaju jest jednoczesna obecność trzech enzymów: DNA-zy, lipazy i żelatynazy. Bakterie te kolonizują bardzo zróżnicowane środowiska, m.in. wodę, glebę, rośliny, owady i dzikie zwierzęta. Są także doniesienia o izolacji tych bakterii z materiału klinicznego pochodzącego od człowieka.

Autorzy niniejszej publikacji po raz pierwszy stwierdzili, że bakteria *S. plymuthica* jest także czynnikiem etiologicznym zgnilizny cebuli. Bakteria ta została wyizolowana z chorych cebul pobranych z trzech różnych gospodarstw zlokalizowanych w Polsce centralnej. Potwierdzono patogeniczność badanych izolatów w stosunku do cebuli [22, 23]. Identyfikację prowadzono metodami fizyko-chemicznymi oraz molekularnymi. Wprawdzie nie wiadomo, jak często *S. plymuthica* wywołuje choroby cebuli, ale bakteria ta może stanowić potencjalne zagrożenie dla upraw cebuli w Polsce.

Gatunek *Serratia marcescens* wywołuje także choroby roślin, m.in. raka bakteryjnego dębu [34], chorobę dyni (*cucurbit yellow vine disease*) [35] oraz w Brazylii zgniliznę cebuli [4].

6. *Pantoea ananatis* (Serrano) Mergaert i wsp.

P. ananatis jest fakultatywnie beztlenową bakterią, wcześniej klasyfikowaną jako *Erwinia ananas* (syn. *Erwinia uredovora*) [27]. Rozkłada ona celobiozę, glicerol, inozytol, melobiozę i sacharozę. Bakteria nie wytwarza natomiast enzymu oksydazy, deaminazy fenyloalaniny i reduktazy azotanowej oraz nie hydrolizuje pektyn, skrobi i żelatyny [36].

Bakteria *P. ananatis* po raz pierwszy została wykryta w 1928 roku na Filipinach, jako czynnik etiologiczny gnicia listków przy owocach ananasów [40]. Od tego czasu była diagnozowana jako sprawca chorób wielu roślin jedno- i dwuliściennych – kukurydzy, ryżu, ananasa, melona [18, 19]. Objawy wywoływane przez tę bakterię są zróżnicowane i uzależnione zarówno od rośliny żywicielskiej, jak i od warunków klimatycznych panujących w kraju, w którym dochodzi do porażenia i rozwoju choroby. Mogą to być: zgnilizny, plamistości, więdnięcia [6]. Patogen wnika do rośliny żywicielskiej poprzez kwiaty, zranienia spowodowane przez owady oraz mechaniczne uszkodzenia. Wykazano także, że wciornastki, szczególnie *Frankliniella fusca,* mogą być wektorami tej bakterii [11, 48]. *P. ananatis* jest bakterią występującą na/w nasionach *seed-born*) oraz przenoszoną przez materiał siewny (*seed-transmitted*) m.in. cebuli, trawy sudańskiej i ryżu [13, 46]. W piśmiennictwie spotkano także doniesienie na temat miękkiej zgnilizny wywoływanej przez *P. ananatis* na jadalnych grzybach *Pleurotus eryngii* [21].

Szybkie rozprzestrzenianie się bakterii doprowadziło do opanowywania nowych krajów, a także zaatakowania nowej rośliny żywicielskiej – cebuli. Choroba cebuli powodowana przez *P. ananatis* została zdiagnozowana w Stanach Zjednoczonych w stanie Georgia w 1997 roku. Straty plonu sięgały wówczas 100% [7]. W szybkim tempie patogen został zawleczony do innych stanów Ameryki, m.in. do Colorado i Michigan. Okazało się, że bakteria była przenoszona wraz z materiałem siewnym i wysadkowym – na nasionach i w cebuli dymce, który pochodził z Południowej Afryki [10]. Ostatnie badania autorów niniejszej publikacji dowiodły, że bakteria *P. ananatis* występuje także na terenie Polski. Została ona wyizolowana z cebuli dymki [22]. Jednakże do tej pory brak danych o zasięgu występowania oraz o potencjalnym zagrożeniu tego patogena dla upraw cebuli na terenie naszego kraju.

Objawy chorobowe na cebuli wywoływane przez *P. ananatis* pojawiają się początkowo na młodszych

liściach. Są to białe paski z brzegami wyglądającymi jakby były nasiąknięte wodą, biegnące wzdłuż liści. W niektórych przypadkach liście mogą więdnąć. Bakterie stopniowo kolonizują dolne części rośliny, aż wreszcie rozwijają się w cebuli. Zainfekowane łuski cebuli są bladożółte do żółtopomarańczowych. Bakterie innych gatunków, w tym saprotrofy, wtórnie wnikają do cebuli, powodując jej rozkład i gnicie. *P. ananatis* nie powoduje rozległych zniszczeń łusek cebuli, gdyż nie posiada enzymów pektolitycznych. Jednakże porażone przez *P. ananatis* cebule częściej są kolonizowane przez inne mikroorganizmy, które rozkładają tkanki łusek. Gniciu towarzyszy charakterystyczny odór. Niestety, stopień zasiedlenia cebul nie jest skorelowany ze stopniem rozwoju choroby na liściach. Często rozwój choroby rozpoczyna się w polu, a ujawnia się ona dopiero w przechowalni. Zatem, zgnilizna środkowych łusek (*center rot*) może także wywoływać duże straty podczas przechowywania cebuli [29, 39].

G o s z c z y ń s k a i wsp. [12], na kongresie fitopatologicznym w Turynie w 2008 roku donosili, iż zgniliznę środkowych łusek cebuli wywołują dwa gatunki *Pantoea* – *P. ananatis* oraz nowy – *P. allii*. Przebadali oni 30 izolatów, wykorzystując następujące metody: analizę FAFLP, hybrydyzację DNA-DNA, analizę 16 rRNA i sekwencję genu *gyr*B. Większość izolatów zidentyfikowano jako *P. ananatis*, natomiast dziewięć izolatów różniło się pod względem genetycznym i dla nich właśnie zaproponowano nową nazwę gatunku – *P. allii*.

7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend. Hauben i wsp. i *Dickeya chrysanthemi* Samson i wsp.

Bakterie te zaliczane do rodziny *Enterobacteriaceae*, są nie tworzącymi przetrwalników, urzęsionymi peritrichalnie, fakultatywnymi anaerobami. Wykazują typowe cechy tej rodziny: fermentują glukozę, nie produkują oksydazy i redukują azotany do azotynów. Podstawowe cechy biochemiczne odróżniające te dwie bakterie od siebie to aktywność fosfatazy, wrażliwość na erytromycynę oraz zdolność do produkcji indolu. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* nie posiada żadnej z tych cech, podczas gdy *D. chrysanthemi* charakteryzuje się ich obecnością. Bakterie te należą do grupy „carotovora", sprawców mokrej/miękkiej zgnilizny [47]. Wytwarzają one liczne enzymy pektolityczne, które odgrywają znaczącą rolę w patogenezie. Enzymy te rozkładają łańcuch pektynowy na krótsze elementy, aż do struktur zawierających kilka lub tylko jedną cząsteczkę kwasu galakturonowego [44]. Aktywność enzymów prowadzi do rozkładu blaszki środkowej komórek roślinnych i powoduje maceracją i dezintegrację tkanek, czemu towarzyszy plazmoliza i zamieranie komórek.

P. carotovorum subsp. *carotovorum* i *D. chrysanthemi* wywołują na cebuli mokrą zgniliznę. Początkowe objawy to małe plamki, wyglądające jakby były nasiąknięte wodą, które gwałtownie powiększają się i występują zarówno na powierzchni, jak i przenikają w głąb penetrowanej tkanki. Tkanka w obrębie porażonego fragmentu staje się kremowo zabarwiona, śluzowata i przekształca się w lekko ziarnistą masę. Powierzchnia porażonych cebul może pozostać nieuszkodzona, podczas gdy wewnętrzne tkanki zmieniają się w mętną, półpłynną papkę. Z czasem cała cebula może ulec przekształceniu w miękką, wodnistą, zgniłą masę. Z gnijących tkanek wydziela się odrażający zapach. Często jest on wynikiem rozkładu tkanki przez wtórnie wnikające bakterie saprotroficzne [41].

Istotne jest, iż oba wymienione gatunki wywołują rozwój choroby w odmiennych warunkach termicznych. Dla *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* jest to 25–30°C, zaś dla *D. chrysanthemi*, zwykle powyżej 33°C [44, 47]. Na rozwój choroby duży wpływ ma także dostępność wody w roślinie. Woda umożliwia łatwiejszą migrację komórek bakteryjnych przez tkanki rośliny. Ponadto im więcej dostępnej wody w roślinie tym mniejsza ilość dostępnego tlenu, co sprzyja rozwojowi tych bakterii.

Dickeya chrysanthemi ma dosyć wąski zakres gospodarzy, na których może wywoływać chorobę. Wśród roślin żywicielskich znajduje się także cebula. Zgnilizna cebuli wywoływana przez tę bakterię notowana jest m.in. w Stanach Zjednoczonych, Meksyku [26] oraz w Hiszpanii [32].

8. *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche et Edwards

E. cloacae jest urzęsioną peritrichalnie, fakultatywnie beztlenową pałeczką. Ze względów diagnostycznych istotne jest to, że nie posiada następujących enzymów: dekarboksylazy lizyny, oksydazy, deaminazy fenyloalaniny, deaminazy tryptofanu i ureazy oraz nie ma zdolności do degradacji pektyny.

W naturze *E. cloacae* występuje w glebie, w wodzie, na nasionach roślin. W sprzyjających warunkach powoduje zgniliznę cebuli (*enterobacter bulb decay*). Bakteria może być wyizolowana ze zdrowych cebul jako oportunistyczny patogen, który jest w stanie wywołać proces chorobowy w wysokiej temperaturze (40–45°C) [39]. Jednakże są doniesienia o infekcji cebul przez tę bakterię także w temperaturze 30°C [37]. Gatunek *E. cloacae* został zidentyfikowany jako czynnik wywołujący gnicie cebuli w Stanach Zjednoczonych [37], Australii [5] i w Polsce [22]. Zasięg choroby nie jest duży, ale z roku na rok wzrasta liczba miejscowości, w których bakteria ta jest wykrywana jako patogen cebuli.

Schroeder i wsp. z Uniwersytetu w Waszyngtonie [38] badali podatność odmian cebuli na porażenie przez *Enterobacter cloacae*. Testowano 69 odmian *Allium cepa* pod względem ich podatności na porażenie podczas przechowywania cebul przez 4,5 miesiąca. Doświadczenie prowadzono przez dwa sezony przechowalnicze. Wykazano zróżnicowaną podatność odmian na porażenie przez *E. cloacae*. Odmiany czerwone okazały się być bardziej odporne na *E. cloacae* niż odmiany białe i żółte. Jednocześnie jednak odmiany te były częściej atakowane przez inne patogeny obecne na łuskach zewnętrznych.

9. Podsumowanie

Choroby bakteryjne cebuli (*Allium cepa* L.) stanowią coraz większe zagrożenie dla upraw cebuli na świecie, jak również w Polsce. Na szczególną uwagę zasługują te gatunki bakterii, które w ostatnich latach zostały zidentyfikowane jako patogeny cebuli na terenie naszego kraju – *P. ananatis*, *E. cloacae*, *S. plymuthica* [22]. Zjawisko pojawiania się nowych patogenów jest dosyć powszechne w przyrodzie. Wiąże się m.in. z łatwym zawleczeniem patogenów wraz z materiałem siewnym lub wysadkowym z innych krajów. Ponadto coraz to nowsze i doskonalsze metody diagnostyczne umożliwiają prawidłową identyfikację mikroorganizmów patogenicznych.

Niniejsze opracowanie obejmuje najnowsze doniesienia na temat czynników etiologicznych wywołujących bakteryjne choroby cebuli na świecie, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków, które zostały zidentyfikowane jako patogeny cebuli na terenie Polski.

Piśmiennictwo

1. Agrios G.N.: Plant Pathology. Elsevier Academic Press, 2005, s. 615–703
2. Aguilar C., Bertani I., Venturi V.: Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1739–1747 (2003)
3. Aguilar C., Friscina A., Devescovi G., Kojic M., Venturi V.: Identification of quorum sensing regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *J. Bacteriol.* **185**, 6456–6462 (2003)
4. Beriam L.O.S.: Palestra doenças bacterianas em hortaliças. *Biologio* **69**, 81–84 (2007)
5. Cother E.J., Dowling V.: Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their possible role in disease expression. *Plant Pathol.* **35**, 329–336 (1986)
6. Coutinho T.A., Venter S.N.: *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 325–335 (2009)
7. Gitaitis R., Gay J.D.: First report of leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Dis.* **81**, 1096 (1997)
8. Gitaitis R., Summer D., Gay D., Smittle D., McDonald G.: Bacterial streak and bulb rot of onion: I. A diagnostic medium for the semiselective isolation and enumeration of *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Dis.* **81**, 897–900 (1997)
9. Gitaitis R., Walcott R.: The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 371–397 (2007)
10. Gitaitis R., Walcott R., Culpepper S., Sanders H., Zolobowska L., Langston D.: Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Protect.* **21**, 983–989 (2002)
11. Gitaitis R., Walcott R., Wells M.L., Perez J.C.D., Sanders F.H.: Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* **87**, 675–678 (2003)
12. Goszczyńska T., Brady C., Venter S.N., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J., Coutinho T.A.: Two seed-borne bacterial species, *Pantoea ananatis* and *P. allii* sp. nov., are associated with centre rot of onion. *J. Plant Pathol.* **90** (Sup.), 357 (2008)
13. Goszczyńska T., Moloto V.M., Venter S.N., Coutinho T.A.: Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. *Seed Sc. Technol.* **34**, 655–668 (2006)
14. Holtsmark I., Eijsink V.G.H., Brurberg M.B.: Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **280**, 1–7 (2008)
15. Jacobs J.L., Fasi A.C., Ramette A., Smith J.J., Hammerschmidt R., Sundin G.W.: Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Appl. Environm. Microbiol.* **74**, 3121–3129 (2008)
16. Janse J.D.: Phytobacteriology principles and practice. CABI, Oxfordshire, 2009
17. Kawamoto S.O., Lorbeer J.W.: Infectious of onions leaves by *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* **64**, 1440–1445 (1974)
18. Kido K., Adachi R., Hasegawa M., Yano K., Hikichi Y., Takeuchi S., Atsuchi T., Takikawa Y.: Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **74**, 302–312 (2008)
19. Kido K., Hasegawa M., Matsumoto H., Kobayashi M., Takikawa Y.: *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and on genetic characteristics. *J. Gen. Plant Pathol.* **76**, 208–218 (2010)
20. Kim Y.K., Lee S.D., Choi C.S., Lee S.B., Lee S.Y.: Soft rot of onion bulbs caused by *Pseudomonas marginalis* under low temperature storage. *The Plant Pathol. J.* **18**, 199–203 (2002)
21. Kim M.K., Ryu J.S., Lee Y.H.: First report of *Pantoea* sp. induced soft rot diseases of *Pleurotus eryngii* in Korea. *Plant Dis.* **91**, 109 (2007)
22. Kowalska B.: Charakterystyka bakterii patogenicznych występujących na cebuli (*Allium cepa* L.) i metody ich zwalczania. Praca doktorska. Skierniewice, 2010
23. Kowalska B., Smolińska U., Oskiera M.: First report of *Serratia plymuthica* causing onion bulb rot in Poland. *Pol. J. Microbiol.* **1**, 85–87 (2011)
24. Lee C.J., Lee J.T., Kwon J.H., Kim B.C., Park W.: Occurence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. *Austral. Plant Pathol.* **34**, 287–292 (2005)
25. Lessie T.G., Hendrickson W., Manning B.D., Devereux R.: Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 117–128 (1996)
26. Lorbeer J.W., LoParco D.P., Zumoff C.H.: Occurrence of a bacterial bulb decay of onion caused by *Erwinia chrysanthemi* in New York. *Phytopathol.* **86**, S3 (1996)
27. Mergaert J., Verdancy L., Keister K.: Transfer of *Erwinia ananas* (synonym *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 162–173 (1993)

28. Mohan S.K., Bijman V.P.: A soft rot of leaves, scapes and bulbs of onion seed crops caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. *Phytopathol.* **88**, S64 (1998)
29. Morohoshi T., Nakamura Y., Yamazaki G., Ishida A., Kato N., Ikeda T.: The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **189**, 8333–8338 (2007)
30. Munkvold G.P.: Seed pathology progress in academia and industry. *Annu. Rev. Phytopathol*. **47**, 285–311 (2009)
31. Ohuchi A., Ohsawa T., Nishimura J.: Two pathogenic bacteria, *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925, causing a soft rot of onion. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* **49**, 619–626 (1983)
32. Palacio-Bielsa A., Cambra M.A., Lopez M.M.: First report of bacterial soft rot on onion caused by *Dickeya* sp. (ex. *Pectobacterium chrysanthemi*) in Spain. *New Dis. Rep.* http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2007/2006-81.asp (2006)
33. Parke J.L., Gurian-Sherman D.: Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 225–258 (2001)
34. Poza-Carrion C., Aguilar I., Gallego F.J., Nunez-Moreno Y., Biosca E.G., Gonzalez R., Lopez M.M., Rodriguez-Palenzuela P.: *Brenneria quercina* and *Serratia* spp. isolated from spanish oak trees: molecular characterisation and development of PCR primers. *Plant Pathol.* **57**, 308–319 (2008)
35. Rascoe J., Berg M., Melcher U., Mitchell F.L., Bruton B.D., Pair S.D.: Identification, phylogenetic analysis, and biological characterization of *Serratia marcescens* strains causing cucurbit yellow vine disease. *Phytopathol.* **93**, 1233–1239 (2003)
36. Schaad N.W., Jones J.B., Chun W.: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press St. Paul, Minnesota, 2001
37. Schroeder B.K., du Toit L.J., Schwartz H.F.: First report of *Enterobacter cloacae* causing onion bulb rot in the Columbia Basin of Washington State. *Plant Dis.* **93**, 323 (2009)
38. Schroeder B.K., Waters T.D., du Toit L.J.: Evaluation of onion cultivars for resistance to *Enterobacter cloacae* in storage. *Plant Dis.* **94**, 236–243 (2010)
39. Schwartz H.F., Mohan S.K.: Compendium of onion and garlic diseases and pests. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, USA, 2008
40. Serrano F.B.: Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. *Philippine J. Science*, **36**, 271–324 (1928)
41. Sobiczewski P., Schollenberger M.: Bakteryjne choroby roślin ogrodniczych. PWRiL Warszawa, 2002, s. 64–67
42. Stoyanova M., Pavlina I., Moncheva P., Bogatzevska N.: Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **21**, 306–310 (2007)
43. Tekoriene R., Lugauskas A., Vasinauskiene M.: Bacteria of the *Pseudomonas migula* genus on stored vegetables. *Acta Sci. Pol.-Hortoru* **2**, 153–160 (2003)
44. Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C., Birch P.R.J.: Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 17–30 (2003)
45. Vandamme P., Dawyndt P.: Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *System. App. Microbiol.* **34**, 87–95 (2011)
46. Walcott R.R., Gitaitis R.D., Castro A.C., Sanders J.F.H., Diaz-Perez J.C.: Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. *Plant Dis.* **86**, 106–111 (2002)
47. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E.: Charakterystyka, identyfikacja, różnicowanie i taksonomia bakteryjnych patogenów roślin z rodzaju *Erwinia*. *Post. Mikrobiol.* **43**, 297–319 (2004)
48. Wells M.L., Gitaitis R.D., Sanders F.H.: Association of tobacco thrips, *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) with two species of bacteria of the genus *Pantoea*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **95**, 719–723 (2002)
49. Wright P.J., Hale C.N.: A field and storage rot of onion caused by *Pseudomonas marginalis*. *N. Zeal. J. Crop Hort.* **20**, 435–438 (1992)
50. Yohalem D.S., Lorbeer J.W.: Distribution of *Burkholderia cepacia* phenotypes by niche, methods of isolation and pathogenicity to onion. *Annu. Appl. Biol.* **130**, 467–479 (1997)

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły drukowane w *Postępach Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na płytach CD lub DVD. Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przygotowane wg. wyżej wymienionych wytycznych należy przesłać na adres Redaktora Działu. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych w języku angielskim.

1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki powinny być dostarczone w wersji elektronicznej oraz w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Maksymalne rozmiary rysunków planowanych w artykule w jednej szpalcie nie powinny przekraczać 7,5 cm × 16 cm (szer./wys.), a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt 11 cm × 21 cm (szer./wys.). Szerokość planowanych tabel nie powinna przekraczać rozmiarów rysunków (odpowiednio 7,5 cm lub 11 cm), a ich wysokość nie powinna być większa od 10 cm, niezależnie od zaplanowanej szerokości tabeli. **Podane wymiary rysunków obowiązują zarówno ilustracje wykonane i załączone w wersji elektronicznej i w papierowej.**

W maszynopisach nie należy pozostawiać wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą „objaśnienia w tekście". Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

1.2.1. Elektroniczne wersje ilustracji

Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako pliki PDF, ale w wersji ostatecznej do druku muszą być dostarczone jako pliki TIFF albo EPS. Pliki pochodzące z programu Power Point akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z programu Power Point) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (ang. Cyan, Magenta, Yellow, blacK). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (ang. Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Pliki kolorowe sporządzone w programie Power Point nie są akceptowane z powodu różnic pomiędzy RGB i CMYK podczas wydruku.

Wszystkie grafiki należy przesyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje musza pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi.

Grafiki należy przesyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielo panelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak płyty CD lub DVD. Przesłane dyski nie będą zwracane autorom. Zalecaną przez redakcję kompresją informacji jest ZIP lub PKZIP (Windows). Redakcja nie akceptuje ilustracji wykonanych Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB. Elementy rysowane, takie jak wykresy, formuły matematyczne czy diagramy nie powinny zawierać dodatkowych naniesień ręcznych i powinny być łatwo odtwarzane w dostępnych programach. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres: jbielecki@biol.uw.edu.pl.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony maszynopisu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasie), np.

Arendsen A.F., Solimar M.Q. i Ragsdale S.W.: Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **181**, 1489–1495 (1999).

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora lub współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu stronę, np.:

Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) Microbial Adhesion and Invasion, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997) (wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

Powoływanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. [10]. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Cytowanie danych z sieci internetowej może jedynie dotyczyć informacji pochodzących z prac oryginalnych zamieszczanych w sieci przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytety z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: 14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, http://cbx.iou.pgr. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane: nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

2. Prawo autorskie

Autorskie prawo osobiste (Ustawa z dn. 4-tego lutego 1994 r., Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.), zwane dalej w Informacji dla Autorów prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu – wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczania" utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów)
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony Autorskich praw osobistych innych Autorów przez Redakcję Postępów Mikrobiologii obliguje nas do przyjęcia następującej procedury:

(a) Reprodukcja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *P.M.* tj. cudzych rysunków lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora/twórcy – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów *P.M.* wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Autorów pierwotnej pracy lub Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *P.M.*

- Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów *P.M.* do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów *P.M.* w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję *P.M.* manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskryptem Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz w przypadku prac metodycznych Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów".

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją **ASM** – można znaleźć w **Instructions to Authors**, *J. Bacteriol., Jan. 2007*.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M.Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and „Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A.C. McWhorter-Murlin and F.W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy

* Fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P.M.* za zgodą Journals Departments ASM.

z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp, typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. enterica sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv. Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Ww. określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp. *Genetics* **54** 61: 76, 1966.

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol–). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (StrS).

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara*, *his*, *rps.*). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o* (np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. *ara*+, *his*+, nie oznacza się natomiast zmutowaych alleli znakiem *minus.*

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawiania liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus , zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutanta – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. $his_{E.coli}$ lub $his_{K\text{-}12}$. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA1* i *glnA2*.

(g) Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelecjonowanym genem lub regionem np. D *trpA432*, *D(aroP--aceE)419*, lub D*his(dhuA hisJ hisQ)1256.* Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – F (ara-lac)1256. Podobnie F (*araB*'-lacZ+)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE*)*1*. Insercję genu his E. coli do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0 kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4.

Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F' 8(*gal*+).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:
- nazwy miar i wag regulowanych przez *Systeme International dc Unites* (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.
- skróty nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD+, NADH, NADPH, NADP+, poly(A), poly(dT) itp.,
- nazwy powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej np. PCR, SDS-PAGE, nazwy ogólnie znanych linii komórkowych np. HeLa, J774
- nazwy jednostek biologicznych; PFU (jednostka formowania łysinek), CFU (jednostka formowania kolonii), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 1805–1812. Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ, n oraz p dla wartości 10–3, 10–6, 10–9 oraz 10–12. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób 14CO2 , 3H2O, H235SO4. Taki sam sposób zapisu stosuje się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. 32S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. 14C aminokwasy, 3H-liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [14C] mocznik, L-[*metylo*-14C] metionina, [g –32P] ATP.

4. Procedura recenzowania i przyjęcia prac

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie tj. ich wartości merytorycznej (Recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez dwóch stałych Recenzentów *P.M.* (lista Recenzentów, patrz Rada Redakcyjna jest również publikowana w każdym zeszycie *P.M.* oraz na stronie internetowej http:www.pm. microbiology.pl). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej *P.M.* Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej.
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego przygotowanych arkuszach

- Recenzenci nie otrzymują zapłaty od PTM za wykonaną pracę.
- Nazwiska Recenzentów z poza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane w każdym 4-tym zeszycie *P.M.* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor *P.M.* ma prawo odwołania się od tej sugestii do Redaktora naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent z poza Rady Redakcyjnej *P.M.*

5. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w Postępach Mikrobiologii nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

Dr Bohdan Jerzy Starościak
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa
tel. (22) 628-08-22 lub 621-13-51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przeglądowe przygotowane zgodnie z wyżej wymienionymi zasadami należy przesłać na adres Redaktora Działu.

INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja Postępów Mikrobiologii (PM), w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba – Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej. Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel/fax (091) 46 616 51, 52, fax (091)46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci. pam.szczecin.pl**)

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania go do druku.

Zalecenia dla Autorów:

1. **Przesyłanie publikacji:**
   - Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami itp.) proszę przesyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
   - Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ew. faxu należy obligatoryjnie podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.

2. Sposób przygotowania manuskryptu – Pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *Postępów Mikrobiologii*** (POST. MIKROB. 2009, **48**, 1, Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:
   - Objętość pracy nie może przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 20 stron maszynopisu.
   - Ilość cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
   - W spisie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopismach naukowych, niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **Oświadczenie dotyczące praw autorskich.** Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *P.M.*

4. **Zalecenia i uwagi dodatkowe:**
   W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów". Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *PM*.
   - Redakcja *PM* zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY.**
   - Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *P.M.*** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

5. Stali recenzenci działu **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:**

   Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)
   Waleria Hryniewicz
   (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)
   Józef Kur (Politechnika Gdańska)
   Anna Przondo-Mordarska
   (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

[Wzór]

Oświadczenie o oryginalności pracy

. . . .
Nazwisko i imię autora (korespondencyjnego)

. . . .

. . . .
Tytuł pracy

. . . .
Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż w/w pracy nie wysłano równolegle do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

Warszawa, dnia . . . .

. . . .
– podpis Autora korespondencyjnego –

– –

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. . . . .

. . . .
(nazwisko/a i imię/ona autora/ów – proszę podkreślić autora korespondencyjnego)

Adres autorów: . . . .

. . . .

Tytuł pracy: . . . .

2. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b)

(a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są dziełem mojej/naszej oryginalnej twórczości (tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu), nie są obciążone jakimikolwiek prawami osób trzecich, ani nie naruszają jakichkolwiek przepisów prawa i interesów dóbr osób trzecich. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji/ ewentualnie w pracy zamieszono cytaty w ramach dozwolonego prawnie prawa cytatu, przy czym wszystkie zamieszczone cytaty zostały należycie oznaczone wraz z wymienieniem twórcy i źródła cytatu.

. . . .
(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

(b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję rysunków

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję tabel

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .
(* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie: . . . .

rysunków: . . . . tabel: . . . . cytowanego tekstu: . . . .

. . . .
(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”[1]

1. Nazwisko i imię autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....

.....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

....
(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

[1] Konflikt interesów występuje, kiedy autor lub zakład pracy autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

Od Redakcji

Uprzejmie proszę PT. autorów o możliwie szybkie uregulowanie zaległych opłat za publikowanie artykułów w *Postępach Mikrobiologii*.
Z góry dziękujemy za pozytywny odzew na naszą prośbę.

Za Redakcję *PM.*
Jerzy Hrebenda

INFORMACJA DLA AUTORÓW
o opłatach za prace publikowane w Postępach Mikrobiologii

Uprzejmie informujemy PT Autorów PM, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat w wysokości 250 PLN + VAT 23% – razem 307,50 PLN za każdy artykuł na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

Opłatę można wnosić indywidualnie. W tym przypadku dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W imieniu Autorów opłatę może wnosić sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskryptem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT. Należy dodatkowo:

- **Przesyłać zgłoszenia** proponowanych do publikacji artykułów wraz z danymi do wystawienia faktury VAT (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) na nr faksem (022) 841-29 49, lub drogą pocztową na adres siedziby Zarządu PTM: 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34.
- Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.**

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty lub zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.
W przypadku nie przyjęcia przez Redakcję do druku pracy zwrot opłaty wraz z korektą faktury dokonany będzie przez księgowość PTM.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemencie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przesyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* (*Acta Microbiologica Polonica*) lub innego czsopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowi instytutów badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:
1/2 strony 250,– zł
cała strona 500,– zł
Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji Postępów Mikrobiologii, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 628 08 22.

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

Uprzejmie informujemy PT Czytelników, że od września 2008 roku na stronie internetowej *Postępów Mikrobiologii* działa wyszukiwarka. Umożliwia ona odnajdywanie informacji zarówno w bieżących jak i archiwalnych zeszytach naszego pisma.

Redakcja i Administrator Strony Internetowej

Ze smutkiem przyjęliśmy wiadomość o śmierci
w dniu 24 listopada 2013 roku
Ś.P.
doc. dr hab. Jadwigi Kermen

Pani Kermen była jedną z tych Osób, dzięki którym powstały „Postępy Mikrobiologii". W latach 1966–1973 była sekretarzem naukowym naszego pisma. Była pracownikiem naukowym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, a następnie przez długie lata Instytutu Badawczego Leśnictwa

Redakcja Postępów Mikrobiologii

SPIS TREŚCI

M. Osiak, N. Pająk, H. Antosz – Wewnątrzkomórkowe receptory NOD-podobne, skutki mutacji w obrębie ich genów 3
K. Leja, K. Czaczyk, K. Myszka – Przemysłowe wykorzystanie bakterii z rodzaju *Clostridium* 15
M. Kurek, I. Greń – Mikrobiologiczne przemiany kwasu wanilinowego 25
M. Kierzkowska, A. Majewska, A. Sawicka-Grzelak, G. Młynarczyk – Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie (GPAC) – diagnostyka i znaczenie kliniczne 35
K. Hupert-Kocurek, A. Banaś, D. Wojcieszyńska, U. Guzik – Ukierunkowana ewolucja enzymów pochodzenia mikrobiologicznego 43
K. Skrzypczak, W. Gustaw, A. Waśko – Rola i znaczenie proteinaz związanych z powierzchnią komórek bakterii *Lactobacillus helveticus* 49
U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszyńska – Mikrobiologiczna degradacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych 61
B. Wiewióra – Grzyby z rodzaju *Neotyphodium* – endofity traw 71
B. Kowalska, U. Smolińska – Bakterie patogenne dla cebuli (*Allium cepa* L.) 81

INFORMACJA DLA AUTORÓW 87

CONTENTS

M. Osiak, N. Pająk, H. Antosz – Intracellular NOD-like receptors, implications of mutations in their genes 3
K. Leja, K. Czaczyk, K. Myszka – Industrial Application of *Clostridium* spp. 15
M. Kurek, I. Greń – Microbial transformation of vanillic acid 25
M. Kierzkowska, A. Majewska, A. Sawicka-Grzelak, G. Młynarczyk – Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) – diagnostic and clinical significance 35
K. Hupert-Kocurek, A. Banaś, D. Wojcieszyńska, U. Guzik – Directed evolution of microbial enzymes 43
K. Skrzypczak, W. Gustaw, A. Waśko – The role and significance of cell – envelope associated proteinases of *Lactobacillus helveticus* bacteria 49
U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszyńska – Microbial degradation non-steroidal anti-inflammatory drugs 61
B. Wiewióra – Grass endophytes of the *Neotyphodium* genus 71
B. Kowalska, U. Smolińska – Onion *(Allium cepa* L.) pathogenic bacteria 81

INFORMATION FOR AUTHORS 87

ERRATA

W zeszycie 4 tom 52 „Postępów Mikrobiologii" w pracy pt. „Udział ludzkiego cytomegalowirusa w mechanizmach karcynogenezy glejaka wielopostaciowego" (str. 355–361) błędnie podano nazwisko jednej z autorek. Powinno być Agnieszka Michalska. Autorkę i czytelników przepraszamy.

Redakcja